

N° d'ordre : 41615

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE LILLE 1

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Discipline : **Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie**

Spécialité : **Biochimie et biologie moléculaire**

par

Pierre MARTINEZ

IMPORTANCE DES GLYCOSAMINOGLYCANES DE SURFACE DANS LES PHENOMENES INFLAMMATOIRES LIES AU CANCER

Soutenu le 16 décembre 2014 devant la commission d'examen :

Président : Pr. Philippe DELANNOY (Université de Lille 1)
Rapporteurs : Dr. Romain VIVES (Université Joseph Fourier)
Dr. Régis DANIEL (Université d'Evry Val d'Essonne)
Examineurs : Dr. Sylvie FOURNEL-GIGLEUX (Université de Lorraine)
Pr. Fabrice ALLAIN (Université de Lille 1)
Dr. Joël PESTEL (Université de Lille1)

Ce travail a été réalisé sous la co-direction du du Pr. F. ALLAIN et du Dr. Joël PESTEL dans le Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR n° 8576 du CNRS, Directeur : Pr Christophe D'HULST; Université de Lille 1).

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

Avant tout, je tiens à remercier les membres du jury :

Monsieur le Professeur Philippe DELANNOY

Pour beaucoup, le choix du président de jury n'est pas chose aisée, pour moi, ce fut presque une évidence...Vous m'avez fait l'honneur d'accepter cette présidence. Pour cela, et pour toutes les discussions passionnantes que nous avons pu avoir au cours de ma thèse, qu'elles soient formelles ou informelles, je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

Monsieur le Docteur Romain VIVES

Vous avez toujours porté un vif intérêt aux travaux menés lors de ma thèse, que ce soit lors de mes comités de suivi de thèse ou de nos différentes rencontres en congrès. Les discussions que nous avons eues ont toutes été très utiles et ont contribué à une partie de mes résultats. Je tiens donc à vous exprimer ma profonde reconnaissance d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse, soyez assuré de mes remerciements les plus sincères.

Monsieur le Docteur Régis DANIEL

Les échanges que nous avons pu avoir au cours de ma thèse ont tous été fructueux et intéressants. Je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse en qualité de rapporteur.

Madame le Docteur Sylvie FOURNEL-GIGLEUX

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'être membre de mon jury en qualité d'examinatrice.

Monsieur le Docteur Joël PESTEL

Je vous remercie d'avoir accepté de codiriger ma thèse avec Fabrice. Vous avez toujours fait part d'une grande disponibilité quand j'en ai eu besoin. Toutes les discussions, que nous avons pu avoir sur la science et autres, m'ont toutes été profitables. Je vous remercie également d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse malgré votre départ en retraite et les nombreuses obligations que vous avez en tant que membre de la SFI. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon respect.

Monsieur le Professeur Fabrice ALLAIN

Ces quelques mots ne suffiront pas à exprimer la reconnaissance que j'ai pour toi. Depuis mon arrivée au Laboratoire jusqu'à la rédaction de ce manuscrit, en passant par les différentes épreuves qui se sont dressées au cours de mon doctorat, tu as toujours été là pour m'encourager et m'aider à les surmonter. Tu as su, *via* la flamme qui t'anime, me transmettre la passion des GAGs, ce qui n'était pas gagné d'avance tellement ce domaine me paraissait complexe à mon arrivée. Ton soutien sans faille et la confiance que tu m'as portée au cours de ces années m'ont permis d'évoluer tant sur le plan scientifique que personnel. J'ai beaucoup apprécié les années passées au sein de ton équipe, et bien que je sois impatient et heureux de découvrir de nouveaux horizons, mon départ me laissera un goût amer. Enfin, tu m'as permis de me rendre à de nombreux congrès, a toujours accepté les différentes missions que j'ai pu prendre en parallèle de mon travail de thèse et m'a permis de collaborer sur différents sujets. Pour tout cela, je tiens à t'adresser un grand merci et mon profond respect.

Je tiens également à remercier tout particulièrement :

Agnès

Comme de nombreux étudiants passés par l'équipe du 122, c'est toi qui m'a formé sur à peu près toutes les techniques utilisées lors de ma thèse. Grâce à ta rigueur et à ton goût des choses bien faites, j'ai beaucoup appris à tes côtés et t'en suis très reconnaissant. De plus, ta sympathie naturelle et ta grande disponibilité font de toi une encadrante de choix, avec qui on a plaisir de travailler. Enfin, ton aptitude à déceler des fautes d'orthographe invisibles pour le commun des mortels m'a bien été utile, particulièrement pour la rédaction de ce manuscrit. Trouve ici mes remerciements les plus sincères et ma profonde gratitude.

Sylvain,

J'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés, que ce soit pour ta rigueur, ton imagination ou encore ton sens de l'humour. En arrivant au Laboratoire, tu m'as fait confiance et intégré à ton projet bien que je n'étais encore qu'un « petit thésard » de première année. Tu m'as fait rencontrer de nombreuses personnes très intéressantes lors de nos différents voyages. Finalement, notre collaboration aura été fructueuse puisqu'un papier a été publié sur ces travaux. Je t'adresse donc mes remerciements les plus sincères et mon amitié et te souhaite bonne chance pour la suite.

Mathieu,

Tu m'as toujours aidé et conseillé au cours de ma thèse et a toujours été là quand j'en avais besoin. Grâce à ton expertise en biochimie et en production de protéines, j'ai beaucoup appris en travaillant avec toi. Ta bonne humeur et ton entrain ont su me faire relativiser lors de périodes, parfois longues, sans résultats. Je t'adresse donc mes remerciements et ma gratitude.

Monsieur le Professeur Gérard Vergoten,

Je tiens à vous remercier pour les heures passées sur la modélisation moléculaire, ainsi que pour l'intérêt que vous avez porté à mon projet durant ces trois années. Soyez assuré de l'expression de mes sincères remerciements.

Anne-Sophie

Voilà maintenant plus de trois ans que nous travaillons dans la même équipe et dans le même bureau. Bien qu'il n'est pas facile tous les jours de te supporter :), ta présence a toujours été d'un grand soutien pour moi, dans les moments joyeux comme dans ceux qui l'étaient moins. Je te remercie pour tous les services rendus, pour les bonnes soirées passées ensemble et pour ta bonne humeur quotidienne qui ont contribué à ce que mes années de thèse soient des plus agréables. Je te souhaite que des bonnes choses pour la suite, je n'ai pas doutes quant à ta capacité à réussir dans la recherche.

Maxime

Tu as pris le flambeau de l'étude de la polarisation des macrophages, je te souhaite bon courage pour mener à bien ce projet. Connaissant tes capacités scientifiques et ton goût pour la recherche, je suis persuadé que tu arriveras au terme de ton projet sans soucis. J'ai beaucoup apprécié ta présence au Laboratoire, qui nous a permis de rendre le pouvoir aux hommes :) Enfin, je tiens à te remercier pour l'aide que tu m'as apporté ces derniers mois.

Héla

Depuis les premières années de licence, nous avons usé les bancs de la fac ensemble. J'ai été très content que tu intègres l'équipe de Fabrice, ta joie de vivre et ta bonne humeur ont participé à la bonne ambiance régnant au 122. Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Charles

Le petit nouveau de l'équipe... Je te souhaite autant de plaisir que j'en ai eu à travailler dans l'équipe et te souhaite bon courage pour l'année qui arrive, tu en auras besoin. Cependant, connaissant ta capacité de travail et ta compréhension rapide des choses, je ne me fais pas de soucis pour toi.

Patricia et Kristel

Tu as toujours été là pour moi au cours de ces années de thèse, dans les bons moments comme dans les mauvais, que ce soit d'un point de vue professionnel ou personnel. Je te remercie pour le soutien que tu m'as apporté. Nos discussions au « coin cigarette » me manqueront. Je tiens également à remercier Kristel qui a été d'une gentillesse et d'une serviabilité à toute épreuve à mon égard, vous êtes vraiment des voisines de Labo en or.

L'équipe du Pr. Lacroix

Sébastien, je te remercie pour ta disponibilité et ta générosité. Tu m'as mis le pied à l'étrier pour tout ce qui est conseil d'ED, conseil de Labo, etc., ce qui m'a permis d'élargir ma vision de la recherche et du monde scientifique. Je te souhaite bonne chance pour ta nouvelle vie dans le Montana, je suis persuadé que tout se passera bien pour toi. J'en profite pour remercier les autres membres de l'équipe du Pr. Lacroix, Jacqueline, les deux Edwige, Olivier et Peggy qui n'ont jamais refusé de m'aider dans mes travaux. L'aide que vous m'avez apporté, technique et matérielle, m'a fait gagner un temps considérable lors de ces années de thèse.

L'équipe du Dr. Guerardel

Je tiens à vous remercier pour toute l'aide, technique et matérielle, que vous m'avez fourni au cours de mes années de thèse. Mes nombreux passages au second étage ont toujours été un plaisir. Je remercie particulièrement Yann, Christophe M., Christophe B., Manu et tous les concernés pour leur accueil chaleureux du vendredi après-midi.

L'équipe du Dr. Lippens

Isabelle, je te remercie pour tes conseils avisés et l'aide que tu m'as fournie au cours de ces années. Je remercie également le reste de l'équipe pour toute l'aide qu'ils m'ont fourni.

Florent et Jorick

Vous m'avez manqué ces derniers mois, le C9 sans vous, c'était moins drôle... En tout cas, je vous remercie pour tous les moments passés ensemble, les fous rires, les soirées et les discussions toutes plus intéressantes les unes que les autres. Jorick, je te souhaite bon courage pour ton post-doc à Vienne, j'attends toujours que tu m'invites :) Florent, une spéciale dédicace pour toutes les soirées passées ensemble, je viendrai bientôt à Liverpool, bon courage pour la suite.

Les étudiants et ex-étudiants de l'UGSF

Je remercie tous les étudiants qui ont croisé mon chemin à l'UGSF et qui ont contribué à la bonne ambiance qui règne dans ce bâtiment. Je pense à Adeline, Esthelle, Marie, Stéphanie, Karine, Steffi, Clément, Eudoxie, Sven, Cindy, Agata, Lucie, Thomas, Florent, Juan, Maud, Hugo, Jérôme (même si il n'est plus étudiant). Je m'excuse d'avance pour ceux que j'ai oubliés.

Je remercie aussi toutes les autres personnes dont j'ai croisé la route durant ces 3 dernières années, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et qui ne sont pas cités ici, ils se reconnaîtront.

D'une manière plus personnelle, je remercie aussi :

Mes parents

Maman, Papa, je tiens à vous remercier pour tout le soutien que vous m'avez apporté aux cours de ces années. Vous avez toujours été là pour moi et je sais que je ne serai pas où je suis si vous n'aviez pas été là. Vous aurez finalement réussi à faire quelque chose de votre fils, et ce n'était pourtant pas gagné d'avance :) Maman, je t'adresse un merci particulier pour m'avoir supporté et pour avoir fait preuve d'une patience sans limites, je souhaite à tout le monde d'avoir une mère comme toi. Papa, de la même manière, un grand merci pour tout, avec Christelle vous avez toujours été là et je vous en suis infiniment reconnaissant.

Ma famille

Je remercie tous les membres de ma famille pour m'avoir soutenu lors de ces années. Une pensée particulière part pour mes frères et sœurs, Laëtitia, Jonathan, Marion et Maximilien. J'adresse aussi un grand merci à mes grands-parents qui ont toujours fait preuve d'une grande attention à mon égard. Pépé et Françoise, un merci tout particulier, vous m'avez toujours suivi et c'est aussi un peu grâce à vous que j'en suis là. Ju et Mimi, je vous avais promis une dédicace, la voilà, un grand merci pour toutes ces années, elles auraient été beaucoup moins agréables sans vous.

Mes amis

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui m'ont soutenu au cours de ces années de thèse, ils se reconnaîtront.

Typhaine

La meilleure pour la fin... Tu m'as supporté durant ces longues années d'études et je sais que ça n'a pas toujours été facile. Je te dédie d'ailleurs cette thèse qui n'aurait jamais pu voir le jour sans toi. Sache que je n'oublie pas tout ce que tu as fait pour moi depuis maintenant plus de 9 ans, je ne saurai trouver les mots justes pour te remercier comme tu le mérites. Tu es une femme formidable, j'ai vraiment de la chance de t'avoir...

Résumé (en français)

Les protéoglycanes membranaires sont des molécules composées d'une partie protéique liée à la membrane cellulaire et de chaînes glycaniques composées d'héparane et/ou de chondroïtane sulfate. Ces molécules, qui appartiennent à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs), sont des polysaccharides linéaires formés par la répétition d'unités disaccharidiques pouvant être sulfatées sur différentes positions. Ces modifications sont dynamiques et réalisées par plusieurs familles de sulfotransférases dont l'expression varie en fonction du type cellulaire et du microenvironnement, conférant aux GAGs une large diversité structurale. Ainsi, ils interagissent avec une large variété de facteurs extracellulaires et participent à la régulation de nombreux processus physiologiques.

Ces dernières années, différentes sous-populations de macrophages ont été caractérisées en fonction de l'environnement tissulaire. En présence de cytokines Th1 et d'agonistes des TLRs, les macrophages subissent une activation dite "classique" ou M1, qui se caractérise par une activité microbicide élevée et la sécrétion de nombreux facteurs pro-inflammatoires. En revanche, des cytokines Th2 telles que l'IL-4 induisent une activation dite "alternative" ou M2 des macrophages. Ces derniers sont connus pour leur rôle dans les processus de réparation tissulaire et de résolution de l'inflammation. Les macrophages associés aux tumeurs constituent une sous-classe de macrophages dont l'activité participe au maintien et à la progression des tumeurs. Il a été proposé que la production élevée d'IL-4 dans l'environnement tumoral contribue à une activation alternative, aboutissant à un environnement tolérant, favorable à la croissance des cellules cancéreuses.

Des travaux antérieurs avaient montré que l'IL-4 se lie à différents types de GAGs, mais peu d'études ont été réalisées par la suite sur le rôle physiologique de ces interactions. Sur la base de ces données, la première partie de ma thèse a consisté à étudier le rôle des GAGs dans la polarisation M2 des macrophages induite par l'IL-4. Nous avons ainsi montré que la présence de GAGs particuliers à la surface des macrophages est indispensable pour une réponse IL-4 optimale, suggérant une importance de ces molécules dans l'acquisition de leur phénotype pro-tumoral. Parallèlement, nous avons entrepris une analyse structurale afin de mieux comprendre les paramètres de fixation. Nous avons modélisé l'interaction *in silico*, ce qui nous a permis d'identifier des acides aminés de l'IL-4 potentiellement impliqués dans la formation du complexe.

Bien qu'il ait été montré que de nombreux métabolismes soient modifiés lors de la polarisation des macrophages, celui des GAGs n'a jamais été étudié dans ce contexte. Nous avons donc comparé la structure et la machinerie de biosynthèse des GAGs dans les macrophages M1 et M2. Nos données montrent qu'en fonction de leur polarisation, les macrophages expriment des GAGs de surface différents, ce qui peut leur conférer des fonctions spécifiques. Nous avons ainsi montré que les GAGs présents sur les macrophages M2 sont efficaces pour présenter le FGF-2 aux cellules cancéreuses et transactiver son activité mitogène, ce qui est en accord avec l'activité pro-tumorale associée à la polarisation M2.

Finalement, le dernier volet de la thèse a porté sur l'importance des interactions GAGs/sélectines et leur possible implication dans les métastases des cancers du sein. L'étude a confirmé que les GAGs portés par les cellules cancéreuses sont de bons ligands pour les sélectines, et qu'ils pourraient jouer un rôle important dans la promotion des métastases distantes de manière complémentaire à l'antigène sialyl-Lewis X.

Résumé (en anglais)

Cell-surface proteoglycans consist of a core protein bound to the cell membrane and one or more chains of heparan and/or chondroitin sulfate. These molecules, which belong to the family of glycosaminoglycans (GAGs), are linear polysaccharides composed of repeating disaccharide units, sulfated at different positions. These modifications are catalysed by several families of sulfotransferases, for which the expression varies depending on cell type and microenvironment, thus conferring a broad structural diversity to GAGs. Consequently, they interact with a plethora of extracellular factors and are involved in the regulation of many cellular processes.

Over the past few years, different macrophage subpopulations have been characterized depending on the tissue environment. In the presence of Th1 cytokines and TLR agonists, macrophages undergo a classical activation termed M1, which is characterized by high anti-microbial activity and secretion of many pro-inflammatory factors. Conversely, Th2 cytokines, such as IL-4, drive macrophages in an alternative way, called M2. These macrophages are rather involved in tissue remodelling and resolution of inflammation. Tumor-associated macrophages are described as a subset of macrophages, which contributes to the maintenance and progression of tumors. It was postulated that high IL-4 production in the tumor environment may participate in an alternative activation, resulting to a tolerant environment for growth of cancer cells.

Previous studies had shown that IL-4 binds to different types of GAGs. However, few studies focused on the physiological role of these interactions. Based on these data, the first part of my thesis was to study the role of GAGs in IL-4 induced M2 polarization of macrophages. We demonstrated that the response to IL-4 is dependent on the presence of specific cell-surface GAGs, suggesting the importance of these molecules in the acquisition of a pro-tumoral phenotype. In parallel, we have undertaken a structural analysis to better understand the binding parameters. In this way, we have modelled the GAGs/IL-4 interaction *in silico*, which allowed to identify the amino-acids of IL-4 likely involved in the complex formation.

Although macrophage polarization has been related to dramatic change in many metabolisms, no variation in GAG biosynthesis has been reported so far. In this context, we compared the structural features and biosynthetic machinery of GAGs in M1 versus M2 macrophages. Our results showed that macrophages express different cell-surface GAGs depending on their polarization, which may be related to their specific functions. We then demonstrated that GAGs at the membrane of M2 macrophages efficiently present FGF-2 to tumor cells in a way that transactivates the proliferative activity of the growth factor, which is in accordance with the pro-tumoral activity of these cells.

Finally, the last part of the thesis was focused on the importance of GAGs/selectin interactions and possible involvement in breast cancer metastasis. We confirmed that GAGs at the surface of tumor cells are good ligands for selectins. Also, they may play a critical role in the promotion of distant metastases as a complement to the sialyl Lewis X antigen.

Abréviations

2-OST : 2-*O*-sulfotransférase

3-OST : 3-*O*-sulfotransférase

6-OST : 6-*O*-sulfotransférase

ADCC : *Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*

AH: Acide Hyaluronique

AT-III: Anti-Thrombine-III

BMP: *Bone Morphogenetic Protein*

C/EBP β : *CCAAT/enhancer-binding proteins*

C4ST: *Chondroitin 4-O-sulfotransferase*

C6ST: *Chondroitin 6-O-sulfotransferase*

CHST: *Carbohydrate Sulfotransferase*

CPA: Cellules présentatrices d'antigènes

CS: Chondroïtane Sulfate

CTL: *Cytotoxic T Lymphocyte*

CTSC: Cathepsine C

D4ST: *Dermatan 4-O-sulfotransferase*

DS: Dermatan Sulfate

DSE: *Dermatan Sulfate Epimerase*

EGF: *Epidermal Growth Factor*

ESL-1: *E-Selectin Ligand 1*

EXT: *Exostosin glycosyltransferase*

EXTL: *Exostosin glycosyltransferase Like*

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

FN: Fibronectine

GAG: Glycosaminoglycane

Gal: Galactose

GalNAc: *N*-acétyl galactosamine

GlcNAc: *N*-acétyl glucosamine

GlcUA: Acide glucuronique

GM-CSF: *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

HAS: Hyaluronate synthétases

HBP: *Heparin Binding Proteins*

HCV: *Hepatitis C Virus*

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

HLA: *Human Leukocyte Antigen*

HPRT: *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase*

HS: Héparane Sulfate

HS2ST: *Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase*

HS3ST: *Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase*

HS6ST: *Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase*

HSV-1 : *Herpes Simplex Virus 1*

IdoUA : Acide iduronique

IFN- γ : Interféron- γ

IL: Interleukine

IRS : *Insulin Receptor Substrates*

KIR : *Killer Inhibitory Receptors*

KS : Kératane sulfate

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*

M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor*

mDC : Cellules dendritiques myéloïdes

MDSC : *Myeloid-derived Suppressor Cells*

MMP : *Matrix Metalloproteinase*

MRC1 : *Mannose Receptor C-type 1*

NCR : *Natural Cytotoxic Receptors*

NDST : *N-déacétylases/N-sulfotransférases*

NK : *Natural Killer*

NKG2D: *Natural-Killer Group 2, member D*

NKP30/44/46: *Natural killer cell p30/44/46-related protein*

NKT: *Natural Killer T*

NO: *Nitric Oxide*

PAPS: *Phospho-adénosyl phosphosulfate*

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

PGE2: *Prostaglandine E2*

PI3K: *Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase*

PKC: *Protein Kinase C*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

RT-PCR: *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*

siRNA: *small-interfering RNA*

sLeX: *sialyl-Lewis X*

SLRP: *Small Leucine-rich Proteoglycan*

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

Sulf: *Sulfatases*

TAM: *Tumor Associated Macrophages*

TCR: *T-cell Receptor*

TGF: *Transforming Growth Factor*

Th: *T helper*

TLR: *Toll-Like Receptors*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

UST: *Uronosyl 2-O-sulfotransferase*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Introduction | 1 |
| Généralités | 4 |
| CHAPITRE 1 : LES GLYCOSAMINOGLYCANES ET PROTEOGLYCANES | 4 |
| I. Structure des glycosaminoglycanes | 4 |
| 1.1. L'acide hyaluronique | 4 |
| 1.2. Les kératanes sulfates | 5 |
| 1.3. L'héparine et les héparanes sulfates | 6 |
| 1.4. Les chondroïtanes et dermatanes sulfates | 7 |
| II. Localisation des glycosaminoglycanes | 8 |
| 2.1. L'acide hyaluronique | 8 |
| 2.2. Les protéoglycanes extracellulaires | 8 |
| 2.2.1. Les hyalectanes | 9 |
| 2.2.2. Les SLRPs | 11 |
| 2.2.3. Les protéoglycanes de la lame basale | 14 |
| 2.2.4. Les protéoglycanes circulants | 16 |
| 2.3. La serglycine, un protéoglycane intracellulaire | 17 |
| 2.4. Les protéoglycanes membranaires | 18 |
| 2.4.1. Les syndécans | 18 |
| 2.4.2. Les variants du CD44 | 21 |
| 2.4.3. Les autres protéoglycanes transmembranaires | 22 |
| 2.4.4. Les protéoglycanes liés via une ancre GPI | 25 |
| III. Biosynthèse des héparanes et chondroïtanes sulfates | 28 |
| 3.1. Etape d'initiation de la biosynthèse | 28 |
| 3.2. Elongation et maturation des chaînes HS | 29 |
| 3.2.1. Mécanisme général | 29 |
| 3.2.2. Les HS polymérase | 30 |
| 3.2.3. Les N-déacétylases/N-sulfotransférases | 32 |
| 3.2.4. La C5-épimérase | 36 |
| 3.2.5. La 2-O-sulfotransférase | 38 |
| 3.2.6. Les 6-O-sulfotransférases | 40 |
| 3.2.7. Les 3-O-sulfotransférases | 42 |
| 3.2.8. Les 6-O-endosulfatases | 45 |
| 3.3. Elongation et maturation des CS/DS | 48 |
| 3.3.1. Mécanisme général | 48 |
| 3.3.2. Les CS/DS polymérase | 49 |
| 3.3.3. Les C5-épimérase | 50 |
| 3.3.4. Les 4-O-sulfotransférases | 52 |
| 3.3.5. Les 6-O-sulfotransférases | 54 |
| 3.3.6. La 2-O-sulfotransférase | 55 |
| IV. Fonctions biologiques des HS et CS/DS | 57 |
| 4.1. Interactions GAGs/protéines | 57 |
| 4.1.1. Paramètres de fixation | 57 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.2. Spécificité des interactions | 60 |
| 4.2. Processus biologiques médiés par les GAGs | 61 |
| 4.2.1. Organisation de la matrice extracellulaire | 62 |
| 4.2.2. Migration cellulaire | 63 |
| 4.2.3. Activité anticoagulante | 64 |
| 4.2.4. Participation aux complexes de signalisation | 64 |
| 4.2.5. Internalisation de protéines | 66 |
| 4.2.6. Fixation d'agents pathogènes | 67 |
| CHAPITRE 2 : LE ROLE DU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LES CANCERS | 68 |
| I. Les cellules de l'immunité tumorale | 69 |
| 1.1. Les cellules du système immunitaire inné | 70 |
| 1.1.1. Les neutrophiles | 71 |
| 1.1.2. Les cellules NK | 73 |
| 1.1.3. Les cellules NKT | 76 |
| 1.1.4. Les lymphocytes $T\gamma\delta$ | 77 |
| 1.1.5. Les MDSC | 79 |
| 1.1.6. Les macrophages | 81 |
| 1.1.7. Les cellules dendritiques | 84 |
| 1.2. Les cellules du système immunitaire adaptatif | 87 |
| 1.2.1. Les lymphocytes $T CD8^+$ (CTL) | 88 |
| 1.2.2. Les lymphocytes $T CD4^+$ | 89 |
| 1.2.3. Les lymphocytes Treg | 90 |
| 1.2.4. Les lymphocytes B | 92 |
| II. L'échappement à la réponse anti-tumorale | 93 |
| 2.1. Modifications de l'immunogénicité | 94 |
| 2.2. Subversion du système immunitaire | 95 |
| III. Les métastases et le système immunitaire | 97 |
| 3.1. Formation des métastases | 97 |
| 3.2. Processus inflammatoires pro-métastatiques | 99 |
| 3.2.1. L'angiogénèse | 100 |
| 3.2.2. Remodelage tissulaire et intravasation | 101 |
| 3.2.3. Circulation et extravasation des cellules métastatiques | 101 |
| 3.2.4. Préparation des sites pré-métastatiques | 103 |
| CHAPITRE 3 : LES GAGS ET LE CANCER | 105 |
| OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE | 110 |
| Travaux personnels | 112 |
| CHAPITRE 1 : ROLE DES GAGS DANS LA POLARISATION M2 DES MACROPHAGES INDUITE PAR L'INTERLEUKINE-4 | 112 |
| I. Introduction | 112 |
| II. Partie expérimentale | 115 |
| 2.1. Matériels et méthodes | 115 |
| 2.1.1. Matériel | 115 |

| | |
|---|------------|
| 2.1.2. <i>Isolement des monocytes du sang et polarisation M2 in vitro</i> | 116 |
| 2.1.3. <i>Détection des protéines par immunorévélation</i> | 116 |
| 2.1.4. <i>Analyse et quantification de l'expression des ARNm par RT-qPCR</i> | 117 |
| 2.1.5. <i>Cytofluorimétrie en flux</i> | 118 |
| 2.1.6. <i>Invalidation de gènes par ARN interférence</i> | 119 |
| 2.1.7. <i>Modélisation moléculaire</i> | 119 |
| 2.1.8. <i>Construction des vecteurs d'expression</i> | 120 |
| 2.1.9. <i>Production et purification de l'IL-4 recombinante</i> | 122 |
| 2.1.10. <i>Analyses statistiques</i> | 123 |
| III. Résultats | 123 |
| 3.1. <i>Caractérisation des marqueurs de l'activation M2 des macrophages</i> | 123 |
| 3.2. <i>Rôle des GAGs membranaires dans l'activité de l'IL-4</i> | 124 |
| 3.3. <i>Invalidation des sulfotransférases</i> | 126 |
| 3.4. <i>Compétition avec des oligosaccharides dérivés de GAGs</i> | 131 |
| 3.5. <i>Modélisation moléculaire des interactions GAGs/IL-4</i> | 132 |
| 3.6. <i>Production et purification de l'IL-4 recombinante</i> | 134 |
| IV. Discussion | 137 |
| CHAPITRE 2: MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DES GAGS INDUITES PAR LA POLARISATION M1/M2 DES MACROPHAGES | 142 |
| I. Introduction | 142 |
| II. Publication | 145 |
| III. Résultats complémentaires | 159 |
| IV. Discussion | 162 |
| CHAPITRE 3 : ROLE DES GAGS DANS LES METASTASES DE CANCERS DU SEIN | 165 |
| I. Introduction | 165 |
| II. Publication | 168 |
| III. Discussion | 200 |
| Conclusion générale | 204 |
| Bibliographie | 210 |

Introduction

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Equipe « Diversité structurale des héparanes sulfates et régulation de la réponse inflammatoire » dirigée par le Pr. Fabrice ALLAIN. Il a été dirigé conjointement par le Dr. Joël PESTEL et le Pr. Fabrice ALLAIN.

Les glycosaminoglycanes (GAGs) connaissent un regain d'intérêt depuis plusieurs années, en raison notamment de leurs implications dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Toutefois, les mécanismes qui régulent leur diversité structurale sont loin d'être complètement élucidés. L'objectif de mon travail de thèse a été de décrypter certains de ces mécanismes, en ciblant mes études dans le contexte particulier des relations entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses.

Les héparanes et chondroïtanes sulfates sont des GAGs formés par la répétition d'unités disaccharidiques pouvant être sulfatées sur différentes positions. Ces modifications sont dynamiques et réalisées par plusieurs familles de sulfotransférases, dont l'expression varie en fonction du type cellulaire et du microenvironnement, ce qui confère aux GAGs une large diversité structurale. Ainsi, héparanes et chondroïtanes sulfates sont des régulateurs essentiels de nombreux processus physiologiques, grâce aux interactions qu'ils engagent avec de multiples partenaires protéiques extracellulaires.

Parmi ces facteurs, l'interleukine-4 (IL-4) intervient dans différents processus liés à l'immunité. L'un d'entre eux est l'activation M2 des macrophages. En effet, différentes sous-populations de macrophages ont été caractérisées en fonction de l'environnement tissulaire. En présence de cytokines Th1 et d'agonistes des TLRs, les macrophages subissent une activation dite "classique" ou M1, qui se caractérise par une activité microbicide élevée et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires. En revanche, des cytokines Th2 telles que l'IL-4 induisent une activation dite "alternative" ou M2 des macrophages. En sus de leur rôle physiologique consistant en la résolution de l'inflammation et le remodelage tissulaire, les macrophages M2 constituent une composante importante de l'environnement des tumeurs cancéreuses, où ils participent à la mise en place d'un état de tolérance favorable à la progression maligne.

Des travaux antérieurs avaient montré que l'IL-4 se lie à différents types de GAGs, mais peu d'études ont été réalisées par la suite sur le rôle physiologique de ces interactions. Sur la base de ces données, le premier chapitre de ma thèse a consisté à étudier le rôle des GAGs dans la polarisation M2 des macrophages induite par l'IL-4. Nous avons ainsi montré que la présence de GAGs particuliers à la surface des macrophages est indispensable pour une réponse IL-4 optimale, suggérant que ces molécules sont nécessaires à l'acquisition de leur phénotype pro-tumoral. Parallèlement, nous avons entrepris une analyse structurale afin de mieux comprendre les

paramètres de fixation. Nous avons modélisé l'interaction *in silico*, ce qui nous a permis d'identifier des acides aminés de l'IL-4 potentiellement impliqués dans la formation du complexe.

Bien qu'il ait été montré que de nombreux métabolismes soient modifiés lors de la polarisation des macrophages, celui des GAGs n'a jamais été étudié dans ce contexte. Dans le second chapitre de ma thèse, nous avons donc comparé la structure et la machinerie de biosynthèse des GAGs dans les macrophages M1 et M2. Nos données montrent qu'en fonction de leur polarisation, les macrophages expriment des GAGs de surface différents, ce qui peut leur conférer des fonctions spécifiques. Nous avons ainsi montré que les GAGs des macrophages M2 sont efficaces pour présenter le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) aux cellules cancéreuses et transactiver son activité mitogène, ce qui est en accord avec l'activité pro-tumorale associée à la polarisation M2.

Enfin, le dernier chapitre de la thèse a porté sur l'importance des interactions GAGs/sélectines et leur possible implication dans les métastases des cancers du sein. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration étroite avec le Dr. Sylvain JULIEN. L'étude a confirmé que les GAGs portés par les cellules cancéreuses sont d'excellents ligands pour les sélectines, et qu'ils pourraient jouer un rôle important dans la promotion des métastases distantes de manière complémentaire à l'antigène sialyl-Lewis X.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications

Marcant A., Denys A., Melchior A., **Martinez P.**, Deligny A., Carpentier M. and Allain F. (2012) Cyclophilin B attenuates the expression of TNF- α in lipopolysaccharide-stimulated macrophages through the induction of B Cell Lymphoma-3. *J. Immunol.* 189, 2023–2032. (IF=5,36)

Martinez P., Vergoten G., Colomb F., Bobowski M., Steenackers A., Carpentier M., Allain F., Delannoy P. and Julien S. (2013) Over-sulfated glycosaminoglycans are alternative selectin ligands: insights into molecular interactions and possible role in breast cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 30, 919–931. (IF=3,72)

Martinez P., Denys A., Delos M., Sikora AS., Carpentier M., Julien S., Pestel J. and Allain F. (2014) Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* pii: cwu137 (IF=3,74)

Communications orales

Julien S., Ivetic A., **Martinez P.**, Carpentier M., Delannoy P. and Burchell J. "Organotropism of breast cancer haemogenous metastasis: are selectin ligands the key factors?" 10th Jenner *Glycobiology and Medicine Symposium*, March 31- April 3, 2012, La Haye.

Julien S., Ivetic A., **Martinez P.**, Carpentier M., Delannoy P., and Burchell J. “Rôle des ligands de sélectines dans le tropisme des métastases du cancer du sein“ *24ème journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG 2012)*, 21-25 mai 2012, Val-Joly.

Pestel J., Nagnan-LeMeillour P., **Martinez P.**, Carpentier M., Denys A. and Alain F. “Microglial cell activation and inflammation triggering” *3rd Workshop on Microbiology in Health and Environment Protection*. 17-20 septembre 2013, Lodz.

Martinez P., Denys A., Carpentier M., Pestel J. and Allain F. “Rôle des glycosaminoglycanes dans la polarisation M2 des macrophages induite par l’IL-4“ *25ème journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG 2014)*, 12-15 mai 2014, Paris.

Martinez P., Denys A., Delos M., Sikora AS., Carpentier M., Julien S., Pestel J. and Allain F. “Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans” *25th Joint Glycobiology Meeting*, 14-16 septembre 2014, Gand.

Communications par affiche

Martinez P., Deligny A., Denys A., Pestel J. and Allain F. “M1/M2 polarization of macrophages is accompanied by a dramatic change in the expression of glycosaminoglycan sulfotransferases.” *22nd Joint Glycobiology Meeting*, November 27-29, 2011, Lille.

Julien S., Ivetic A., **Martinez P.**, Carpentier M., Delannoy P and Burchell J. « Organotropisme des métastases hématogènes du cancer du sein: les ligands des sélectines sont-ils des facteurs clés ? ». *5ème journées du Cancéropôle Nord-Ouest*, 10-11 mai 2012, Deauville.

Martinez P., Denys A., Pestel J. and Allain F. “M1/M2 polarization of macrophages is accompanied by a dramatic change in the expression of glycosaminoglycan sulfotransferases”. *EMBO Workshop: Dr Jekyll and Mr Hyde, the Macrophage in Inflammation and Immunity*. 17-19 janvier 2013, Marseille.

Martinez P., Vergoten G., Colomb F., Carpentier M., Allain F., Delannoy P. and **Julien S.** “Selectins Recognise Cancer-Associated Glycosaminoglycans insights into molecular interactions and possible role in breast cancer metastasis”. *6ème journées du Cancéropôle Nord-Ouest*, 15-17 mai 2013, Deauville.

Martinez P., Denys A., Pestel J. and Allain F. “M1/M2 polarization of macrophages is accompanied by a dramatic change in the sulfation motifs of glycosaminoglycans”. *8th International Conference on Proteoglycans*, 25-29 août 2013, Francfort.

Martinez P., Deligny A., Denys A., Pestel J. and Allain F. “M1 and M2 macrophage polarization is accompanied by a dramatic change in the sulfation pattern of glycosaminoglycans”. *13ème journée André Verbert*, 18 septembre 2013, Lille.

Martinez P., Vergoten G., Colomb F., Carpentier M., Allain F., Delannoy P. and Julien S. “Selectins Recognise Cancer-Associated Glycosaminoglycans insights into molecular interactions and possible role in breast cancer metastasis”. *24th Joint Glycobiology Meeting*, 24-26 novembre 2013, Wittenberg.

Généralités

Chapitre 1 : Les glycosaminoglycanes et protéoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polysaccharides linéaires constitués de la répétition d'unités disaccharidiques. Ces unités sont composées d'une hexosamine, D-glucosamine (GlcN) ou D-galactosamine (GalN), et d'un acide uronique, acide D-glucuronique (GlcUA) ou L-iduronique (IdoUA), ou d'un D-galactose (Gal). Selon la structure de l'unité disaccharidique, les GAGs ont été classés en 4 familles : l'acide hyaluronique (AH) ; les héparanes sulfates (HS) et l'héparine ; les chondroïtanes sulfates (CS) et dermatanes sulfates (DS) et les kératanes sulfates (KS). A l'exception de l'AH, les GAGs sont sulfatés et liés par covalence à des protéines pour former les protéoglycanes.

I. Structure des glycosaminoglycanes

1.1. L'acide hyaluronique

L'AH est une molécule de haut poids moléculaire (10^5 à 10^7 Da) composée de la répétition de l'unité disaccharidique : [acide D-glucuronique (β 1-3) *N*-acétyl-D-glucosamine (β 1-4)]_n (Figure 1). Contrairement aux autres GAGs, l'AH n'est jamais associé à une protéine pour former un protéoglycane et ne subit aucunes modifications. Malgré sa composition et sa structure relativement simple, l'AH a été impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Laurent et al., 1996; Petrey et al., 2014). La biosynthèse de l'AH n'a pas lieu dans l'appareil de Golgi mais à la face interne de la membrane plasmique. Elle est réalisée par des enzymes membranaires appelées hyaluronate synthétases (HAS1, HAS2 et HAS3). Ces enzymes polymérisent l'AH en ajoutant de manière répétée de l'acide glucuronique et de la *N*-acétylglucosamine sur le polysaccharide naissant puis en extrudant le polymère en voie de formation vers le milieu extracellulaire.

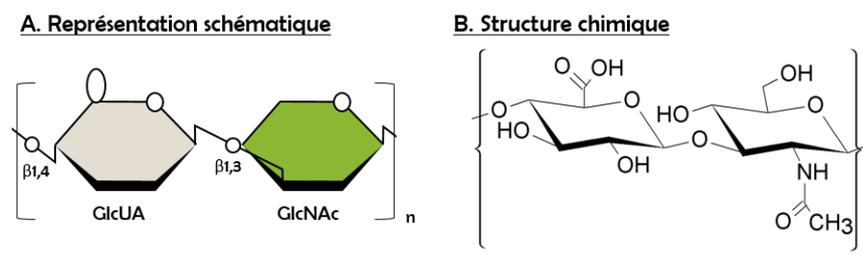


Figure 1: Structure de l'unité disaccharidique de type acide hyaluronique. Le nombre moyen de disaccharides (n) est compris entre 5000 et 30000

1.2. Les kératanes sulfates

Les KS sont les seuls GAGs à ne pas contenir d'acides uroniques, puisque ce sont des polymères de *N*-acétyl-lactosamine [D-galactose (β 1-4) *N*-acétyl-D-glucosamine (β -3)] pouvant être sulfatés en position C6 sur les deux monosaccharides. Ce polysaccharide a été initialement isolé de la cornée, d'où l'appellation « kératane », mais a ensuite été retrouvé dans les cartilages et autres tissus. Les KS issus de ces tissus diffèrent par leur type de liaison au « core » protéique. Les KS de la cornée, appelés KS-I, sont liés *via* une liaison de type *N*-glycane aux protéines, et peuvent éventuellement être fucosylés sur le premier résidu GlcNAc. Alors que ceux isolés des cartilages, appelés KS-II, sont liés *via* une liaison *O*-glycosidique à des résidus de sérine ou de thréonine. Un troisième type de liaison *via* un mannose lié à une sérine a été décrit, et définit les KS-III (Funderburgh, 2000) (Figure 2). Les KS présentent une grande hétérogénéité de taille et de sulfatation. De plus, ils peuvent porter en position terminale non réductrice des résidus d'acide sialique. Les KS sont synthétisés dans l'appareil de Golgi. Les différents types de liaison aux cores protéiques font intervenir des enzymes issues de la biosynthèse des *N*- et *O*-glycanes. La polymérisation et la sulfatation des résidus Gal et GlcNAc font ensuite intervenir plusieurs glycosyltransférases et 6-*O*-sulfotransférases (Quantock et al., 2010).

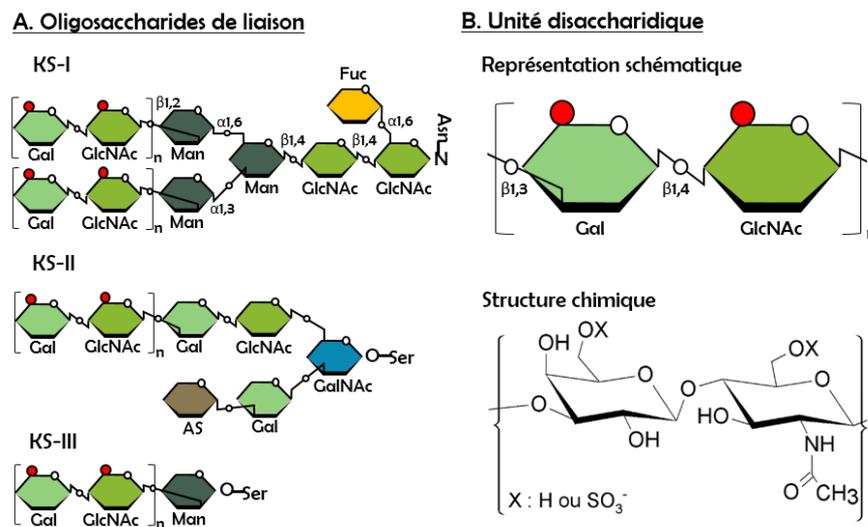


Figure 2: Structure des kératanes sulfates. (A) Structures des oligosaccharides de liaison. (B) Structure de l'unité disaccharidique de type KS. Le nombre moyen de disaccharides (n) est inférieur à 30.

1.3. L'héparine et les héparanes sulfates

L'héparine est composée de la répétition d'unités disaccharidiques formées le plus souvent de résidus IdoUA liés à des GlcN sulfatées. La structure de l'héparine est relativement homogène : les disaccharides sont généralement sulfatés en position 2 des résidus IdoUA et en position N et C6 des GlcN. Plus rarement, ces mêmes résidus GlcN peuvent être sulfatés en position C3 (Figure 3). L'héparine est exclusivement synthétisée par les mastocytes (Esko et al., 2001, 2002; Lindahl et al., 1998; Shriver et al., 2012).

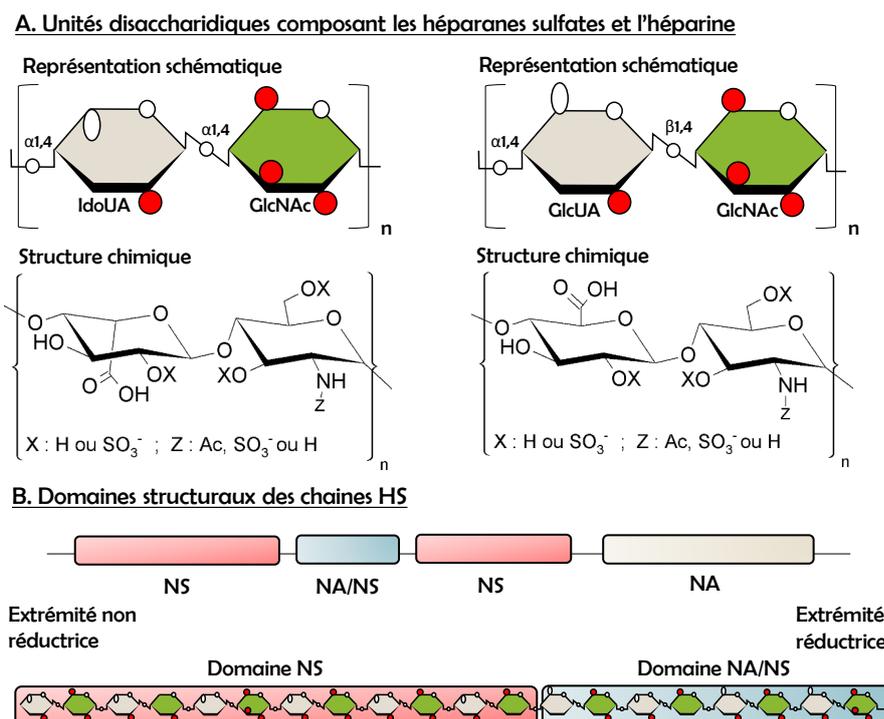


Figure 3: Structure de l'héparine et des héparanes sulfates. (A) Structure des unités disaccharidiques composant l'héparine et les HS. Le nombre moyen de disaccharides (n) est compris entre 30 et 100 dans les HS et entre 20 et 80 dans l'héparine. (B) Domaines structuraux (NA, NA/NS et NS) composant les chaînes HS.

Les HS sont synthétisés par la majorité des cellules et présentent une structure similaire à l'héparine. En effet, ils sont composés de la répétition de la même unité disaccharidique, à la différence près qu'ils contiennent plus de résidus GlcUA. De plus, leur distribution, la longueur du polymère et son degré de sulfatation varient considérablement selon l'espèce, le tissu, le stade de développement et les conditions physiopathologiques. Ils sont organisés en domaines fortement *N*-sulfatés (domaines NS) ou, au contraire, non modifiés (domaines NA), intercalés par des régions de transition constituées d'unités disaccharidiques alternants des GlcN *N*-acétylés et *N*-sulfatés. Le disaccharide le plus représenté dans les chaînes HS est [GlcUA-GlcNAc] mais des disaccharides comportant des GlcUA/IdoUA 2-*O*-sulfatés, des GlcN 6-*O*-

et/ou 3-*O*-sulfatés ou encore des GlcNH₂ sont également retrouvés. A ce jour, 24 disaccharides comportant des modifications différentes ont été identifiés. La biosynthèse des HS et de l'héparine a lieu dans l'appareil de Golgi. Plus de 25 enzymes (glycosyltransferases, sulfotransférases, épimérase) ont été caractérisées, ce qui explique la très large diversité structurale de ces molécules (Esko et al., 2001, 2002; Gandhi et al., 2008; Lindahl et al., 1998; Maccarana et al., 1996; Shriver et al., 2012).

1.4. Les chondroïtanes et dermatanes sulfates

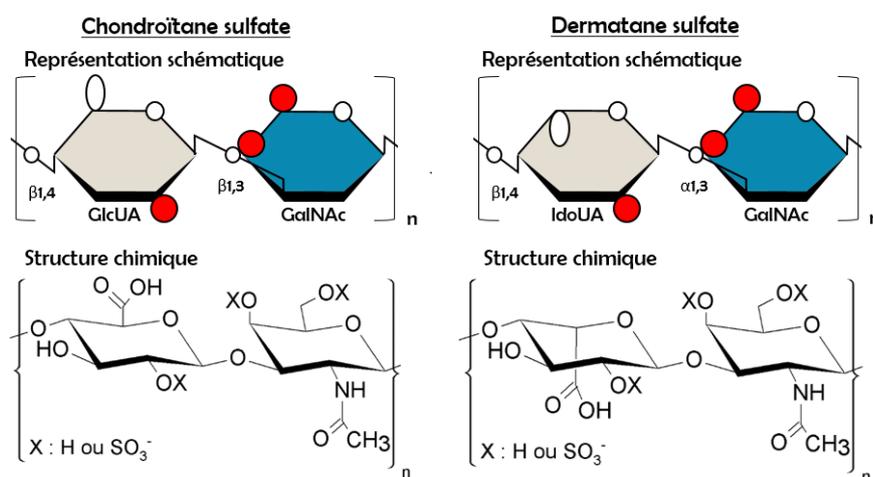


Figure 4: Structure des unités disaccharidiques composant les chaînes CS/DS. Le nombre moyen de disaccharides (n) est compris entre 5 et 50 kDa.

L'unité disaccharidique composant les CS contient un résidu GlcUA lié à une GalNAc par une liaison β 1-3 ([4 acide D-glucuronique (β 1-3) *N*-acétyl-D-galactosamine β 1]) (Figure 4). Elle peut être sulfatée en position C4 et/ou C6 des résidus de GalNAc et en position C2 du résidu GlcUA (Lauder, 2009). Quatre types de CS se distinguent en fonction des disaccharides majeurs les composant. Ainsi, les CS de type A (CS-A) présentent une majorité de disaccharides sulfatés en position C4 du résidu de GalNAc et les CS de type C (CS-C) en C6 du même résidu. Les deux autres types de CS sont plus rares : les CS de type D (CS-D) sont sulfatés en position C2 de l'acide glucuronique et en position C6 du résidu de GalNAc et les CS de type E (CS-E) en position C4 et C6 du résidu de GalNAc. Les DS, ou CS de type B (CS-B), se distinguent des autres CS par la présence de résidus IdoUA dans leur séquence, ce qui leur confère une structure plus flexible (Thelin et al., 2013). Les chaînes de CS et de DS, bien que de structure moins complexe que celle des HS, présentent quand même une certaine hétérogénéité et contiennent toujours plus de deux types de disaccharides (Zhang, 2010). La biosynthèse de ces molécules a également lieu dans l'appareil de Golgi et est réalisée par plus de 15 enzymes différentes (Mikami et al., 2013a).

II. Localisation des glycosaminoglycanes

A l'exception de l'AH, les GAGs sont retrouvés liés à des protéines pour former les protéoglycanes. Ces derniers sont très hétérogènes et difficilement classable en fonction de leur nature. Il est toutefois possible de les classer en fonction de leur localisation. On distingue ainsi les protéoglycanes extracellulaires, intracellulaires et membranaires.

2.1. L'acide hyaluronique

L'AH est essentiellement retrouvé dans les milieux extracellulaires, bien que certains travaux aient aussi décrit une localisation intracellulaire. Les fonctions de ce polysaccharide sont multiples. Initialement décrit comme un constituant architectural des matrices extracellulaires, les premiers rôles qui lui ont été conférés concernent la rétention d'eau et d'ions pour maintenir l'hydratation et la turgescence des tissus. Outre ces propriétés biomécaniques et chimiques, ce polymère peut interagir avec de nombreux partenaires tels que des protéines spécifiques appelés hyaladérines et des récepteurs membranaires comme CD44, RHAMM (*Hyaluronan-mediated motility receptor*), HARE (*Hyaluronan Receptor for Endocytosis*) et les TLR-2 et -4 (*Toll-Like Receptors*). Via ces interactions, il est capable de moduler de nombreux processus physiologiques tels que le développement, la morphogenèse, la tumorigenèse, la migration, l'apoptose, la survie cellulaire ou encore l'inflammation. L'AH interagit également avec de nombreux protéoglycanes présents dans les matrices extracellulaires et est ainsi un acteur majeur de la formation et de l'organisation de ces matrices (Nusgens, 2010).

2.2. Les protéoglycanes extracellulaires

Les protéoglycanes extracellulaires sont généralement classés en quatre grandes familles, en fonction de leur localisation et de leur capacité à lier l'AH. Tout d'abord la famille des hyalectanes (ou lecticanes) est localisée dans les matrices extracellulaires et se lie à l'AH et/ou à des lectines (Schaefer et al., 2010). On retrouve aussi dans les matrices extracellulaires la famille des petits protéoglycanes riches en leucine (SLRP) qui ne peuvent pas lier l'AH (Chen et al., 2013). La troisième famille est retrouvée dans les lames basales et ne lie pas non plus l'AH (Yurchenco, 2011). Enfin, la dernière famille regroupe les protéoglycanes dits « circulants ».

2.2.1. Les hyalectanes

La famille des hyalectanes compte quatre membres : l'aggrécan, le versican, le neurocan et le brévican. Ces protéoglycanes partagent une structure similaire composée de trois domaines. Le premier domaine globulaire, localisé en position N-terminale (Nt), est capable de lier l'AH alors que le domaine globulaire en position C-terminale (Ct) peut lier les lectines. Le domaine central, quant à lui, n'est pas globulaire et contient les sites de liaison des chaînes de GAGs. La taille de ce dernier domaine peut d'ailleurs permettre de prédire le nombre de chaînes GAGs portés par les protéoglycanes, de trois pour le brévican à plus de 100 pour l'aggrécan (Roughley, 2006; Schaefer et al., 2010) (Figure 5).

Le versican est le protéoglycane le plus abondant de la famille des hyalectanes puisqu'on le retrouve dans la plupart des matrices extracellulaires. Il contient dans sa région Nt un domaine *Ig-like* ainsi que deux domaines de liaison à l'AH. Sa partie centrale, qui contient les sites de liaison des chaînes de GAGs, est variable et est le résultat d'un épissage alternatif. Quatre variants existent (V0 à V3) : le variant V0 est le plus long puisqu'il contient deux domaines GAG- α et GAG- β , alors que les variants V1 et V2 ne contiennent qu'un seul domaine GAG- α ou GAG- β , respectivement. Enfin, le variant V3 ne contient aucun de ces deux domaines et ne présente donc pas de chaînes GAGs. Pour les variants V0 à V2, les chaînes de GAGs sont de type CS. Leur nombre diffère en fonction du variant : entre 17 et 23 pour le V0, entre 12 et 15 pour le V1 et entre 5 et 8 pour le V2. Ils peuvent également contenir des sites de *N*- et *O*-glycosylation. Enfin, le dernier domaine du versican, localisé en Ct, contient deux domaines EGF (*Epidermal Growth Factor*)-*like*, un domaine lectine de type C ainsi qu'un domaine de régulation du complément (Iozzo, 1998; Wu et al., 2005). De manière générale, le versican est impliqué dans l'organisation de la matrice extracellulaire. De par les nombreuses interactions qu'il peut engager avec différents partenaires extracellulaires et membranaires (AH, collagène type I, fibrilline-1, fibuline-1, fibronectine, tenascine-R, sélectines P et L, CD44, EGFR, intégrine β 1, TLR2, PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*)), le versican est également un régulateur majeur des interactions cellules-matrices (Du et al., 2013).

L'aggrécan est également un composant majeur des matrices extracellulaires mais on le retrouve principalement dans le cerveau et les cartilages. Il porte une centaine de chaînes CS, une trentaine de chaînes KS ainsi que quelques *N*-glycanes. Ces modifications font de lui le plus grand de tous les protéoglycanes. Sa structure est proche de celle du versican dans les régions Nt et Ct. Sa partie centrale, en revanche, diffère par le nombre de sites de substitutions pour les chaînes glycaniques (CS, KS et *N*-glycanes), bien plus nombreux que dans le versican. L'association d'une centaine de monomères d'aggrécan à des protéines de liaison et à l'AH

conduit à la formation de complexes multimoléculaires, qui peuvent atteindre 100 000 à 200 000 kDa et qui sont responsables en grande partie des propriétés mécaniques des tissus cartilagineux. En effet, la densité élevée en chaînes GAGs confère à ces complexes un caractère très anionique qui leur permet de lier une grande quantité d'eau, conférant ainsi aux cartilages une élasticité et une forte résistance aux stress mécaniques (Aspberg, 2012).

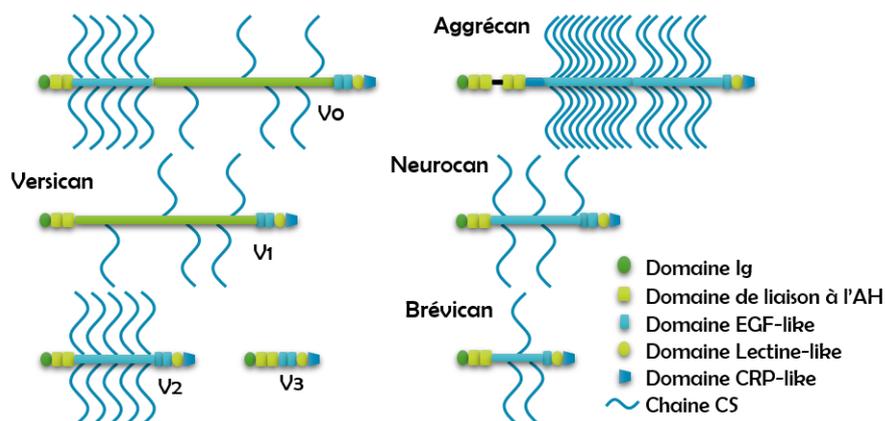


Figure 5: Représentation schématique des membres de la famille des hyalectanes. Les quatre formes d'épissage du versican sont représentées (V0, V1, V2 et V3).

Le neurocane est un protéoglycane à chaînes CS, principalement retrouvé dans les matrices extracellulaires du système nerveux et associé aux processus de remodelage tissulaire. Ses domaines Nt et Ct sont similaires à ceux retrouvés dans le versican et l'aggrécane, mais la partie centrale ne porte en général que quelques chaînes CS (Rauch et al., 2001). Comme les autres hyalectanes, il est capable de former de grands agrégats avec l'AH. Il peut également interagir avec de nombreuses molécules présentes dans les matrices ou à la surface des cellules (héparine, ténascines, FGF-2, HB-GAM (*Heparin-binding growth-associated molecule*), amphotérine, NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*), NgCAM (*Neuronglia Cell Adhesion Molecule*), axonine-1). Ces interactions lui permettent de moduler, entre autres, la croissance neuritique et l'adhérence des cellules neuronales (Yamaguchi, 2000).

Le brévécane est un hyalectane abondant du système nerveux central, retrouvé notamment autour des structures axonales des neurones. Le nombre de chaînes CS varie de 1 à 3 unités. Ses fonctions sont nombreuses et vont de la formation de matrices extracellulaires cérébrales à la régulation de la plasticité synaptique. En effet, les nombreuses interactions avec l'AH, les phospholipides membranaires, les glycoprotéines matricielles, ou encore avec des protéines membranaires font de ce protéoglycane un régulateur essentiel dans de nombreux processus associés au système nerveux. D'un point de vue pathologique, l'expression du

brévican a été reliée au caractère invasif des cellules de gliomes et il a été montré qu'il avait un effet protecteur dans les pathologies neurodégénératives (Frischknecht et al., 2012).

2.2.2. Les SLRPs

Les protéoglycanes de la famille des SLRPs sont caractérisés par la présence d'un domaine central comportant 6 à 10 séquences LRR (*Leucin Rich Repeat*), entouré de régions riches en cystéines. De manière générale, ce sont des petits protéoglycanes (environ 40 kDa) portant une ou deux chaînes CS/DS et/ou plusieurs chaînes KS. A ce jour, 17 SLRPs ont été mis en évidence, principalement localisés dans les matrices extracellulaires. Ils ont été regroupés en cinq classes en fonction de l'organisation de leur gène, de la structure et du nombre de domaines LRR, et enfin de la présence de chaînes GAGs et de leur type (Figure 6).

La classe I regroupe la décorine, le biglycan, l'asporine et l'ECM2, qui peuvent être modifiés par une ou plusieurs chaînes CS/DS et/ou KS. La fibromoduline, le lumican, le kératocan, l'ostéoadhérine et le PRELP (*Proline/arginine-Rich End Leucine-rich repeat Protein*), qui appartiennent à la classe II, ne sont modifiés que par des chaînes KS. La classe III est composée de seulement deux membres : l'épiphican (PG-Lb) et le mimican (ostéoglycan). Le premier possède 2-3 chaînes DS alors que le second porte 2-3 chaînes KS. Enfin, les classes IV et V sont particuliers puisqu'ils ne portent aucune chaîne GAG (Chen et al., 2013).

Les SLRPs ont été initialement décrits pour leur rôle dans la structuration des matrices extracellulaires, mais depuis leur découverte, ils ont été impliqués dans de nombreux autres processus biologiques et pathologiques. Ils ont notamment été décrits dans les cancers comme pouvant agir sur la croissance cellulaire, la survie, les métastases et l'angiogenèse (Kalamajski et al., 2010; Moreth et al., 2012).

La décorine est l'archétype des SLRPs de classe I. Elle est retrouvée dans la plupart des tissus conjonctifs et représente le SLRP majeur dans les tendons et les ligaments (Handley et al., 2006). Elle porte une seule chaîne de GAG qui peut être, selon le tissu, une chaîne DS ou CS (Seidler et al., 2008). Sa production est assurée principalement par les chondrocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. C'est un protéoglycane multifonctionnel impliqué dans l'organisation des matrices, la myogenèse, l'angiogenèse et l'inflammation (Fiedler et al., 2009; Seidler et al., 2008). Elle est capable de lier la plupart des collagènes et régule ainsi la fibrogenèse. Elle interagit également avec de nombreux facteurs de croissance (TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), EGF, IGF (*Insulin-like Growth Factor 1*)) et sert de réservoirs pour ces molécules dans les matrices extracellulaires (Iozzo, 1998; Santra et al., 2002; Schönherr et al., 2005). Toutefois, la majeure partie des

fonctions associées à ce protéoglycane serait imputable à la partie protéique plutôt qu'à la partie glycanique (Sofeu Feugaing et al., 2013). Seules les interactions avec le collagène I, II et III ainsi qu'avec les protéines vWF et LRP impliqueraient sa chaîne GAG (Douglas et al., 2006; Guidetti et al., 2004; Raspanti et al., 2008). La décorine a été impliquée dans de nombreux processus liés aux cancers, où elle aurait une action permissive au développement des tumeurs (Schaefer et al., 2008). La décorine peut en effet se lier à l'EGFR et à d'autres récepteurs de la famille ErbB et ainsi inhiber la fixation de leurs ligands mitogènes (Csordás et al., 2000; Reed et al., 2005; Zhu et al., 2005).

Le biglycan possède 57% d'identité avec la décorine (Schaefer et al., 2008). Il porte en revanche une ou deux chaînes de type DS. Bien que son expression soit ubiquitaire, le biglycan est retrouvé principalement dans les os, les cartilages et les tendons. Il est ainsi le SLRP majeur dans les cartilages articulaires et les fibrocartilages. A l'instar de la décorine, il joue un rôle important dans l'assemblage des matrices extracellulaires. Des souris déficientes en biglycan présentent des défauts au niveau de la fibrogenèse des collagènes et montrent des signes d'ostéoporose précoce suggérant que ce protéoglycane participe aussi au développement osseux (Embree et al., 2010; Zhang et al., 2009). Il peut également interagir avec de nombreux facteurs extracellulaires (TGF- β , TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*)) et ainsi moduler leur activité (Mochida et al., 2006). Le biglycan participe à l'activation de différentes voies de signalisation, telles que celles dépendantes des récepteurs TLR-2 et -4, des récepteurs purinergiques P2X7/P2X4, du récepteur LRP6 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 6*) ou encore du récepteur tyrosine-kinase MuSK (*Muscle-Specific Kinase*). Via ces interactions, le biglycan participe à la modulation de nombreux processus inflammatoires (Frey et al., 2013; Moreth et al., 2012). Il a également été incriminé dans plusieurs formes de cancers, et sa surexpression est souvent corrélée à l'agressivité de la tumeur et à un mauvais pronostic de survie (Gu et al., 2012; B. Wang et al., 2011). Comme la décorine, de nombreuses interactions engagées par le biglycan avec ses partenaires sont assignables à sa partie protéique, les chaînes CS ou DS participant essentiellement aux liaisons avec les différents types de collagène (Douglas et al., 2006).

La fibromoduline est retrouvée principalement dans les cartilages et les tendons. Comme les autres SLRPs, ce protéoglycane est impliqué dans la mise en place et l'assemblage des fibres de collagène et participe ainsi à la résistance des tendons (Jepsen et al., 2002; Knudson et al., 2001). Le rôle de ses chaînes GAGs (2-3 KS) n'est pas complètement défini, mais contrairement aux SLRPs de classe I, leur absence n'affecte pas son interaction avec les collagènes (Font et al., 1998).

Le lumican présente 47% d'homologie de séquence avec la fibromoduline. Initialement décrit dans la cornée, il est maintenant établi qu'il est présent dans de nombreux autres tissus comme la peau, les parois artérielles, les poumons, les reins, les os et les cartilages (Nikitovic et al., 2008b). Dans ces tissus, le lumican est exprimé soit sous la forme d'un protéoglycane, soit sous la forme d'une glycoprotéine peu ou non sulfatée. Plusieurs fonctions lui ont été associées: comme les autres SLRPs, il régule l'assemblage des fibres de collagène, ce qui est primordial pour la transparence de la cornée (Ezura et al., 2000) ; il participe également à la régulation d'autres processus biologiques tels que la prolifération, la migration ou encore l'adhérence cellulaire (Nikitovic et al., 2008a).

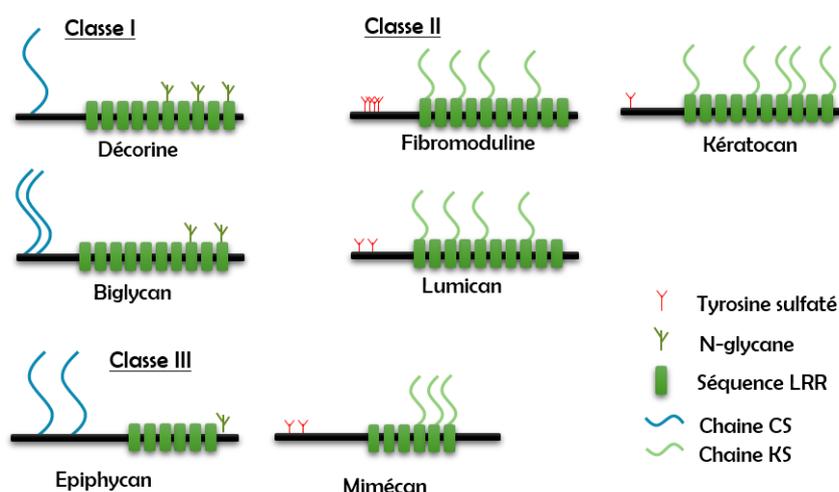


Figure 6: Représentation schématique des membres de la famille SLRPs.

Autre SLRP de classe II, le kératocan présente une très forte homologie de séquence avec le lumican. Sa localisation est également apparentée à celle du lumican puisqu'on le retrouve principalement dans la cornée où il assure des fonctions similaires. Cependant, sa production est principalement assurée par les kératinocytes. De plus, il semble avoir un rôle moins important que le lumican puisque des souris déficientes en kératocan présentent quelques défauts dans la fibrogenèse du collagène mais ont une cornée transparente (Liu et al., 2003; Meek et al., 2003), contrairement aux souris déficientes en lumican qui présentent une cornée opaque et de gros défauts dans l'assemblage des fibres de collagène (Hassell et al., 2010).

Contrairement aux deux précédents, l'ostéoadhérine est exprimée par les ostéoblastes et sa localisation est donc exclusivement osseuse. Ses fonctions ne sont pas encore clairement définies, mais il a été montré que ses chaînes KS avaient un rôle prépondérant dans la minéralisation osseuse (Sugars et al., 2013)

Les deux membres des SLRPs de classe III ont fait l'objet de peu d'études. L'épiphycan porte des chaînes CS/DS et participerait à la différenciation des chondrocytes et à la stabilité des cartilages (Nuka et al., 2010). Quant au mimécan, qui porte des chaînes KS, il participerait à l'assemblage des matrices extracellulaires, notamment dans la cornée, où il assurerait avec d'autres SLRPs le bon déroulement de la fibrogenèse du collagène.

2.2.3. Les protéoglycanes de la lame basale

La lame basale est une matrice extracellulaire spécialisée qui délimite la frontière entre les cellules épithéliales, endothéliales ou musculaires et les tissus conjonctifs sous-jacents. Ses principaux constituants sont les laminines, le nidogène, le collagène de type IV, la fibronectine et des protéoglycannes: perlécan, bamacan, agrine et collagènes XVIII et XV (Erickson et al., 2000).

Le perlécan est le représentant majeur des protéoglycanes de la lame basale. Il est principalement retrouvé dans les organes vascularisés, mais sa présence a également été reportée dans les cartilages et les tissus conjonctifs (Melrose et al., 2004). Son nom provient de son apparence en collier de perles lorsqu'on l'observe en microscopie électronique. Cet aspect est dû à son organisation en domaines globulaires répartis le long d'une structure linéaire (Hassell et al., 2002). Il peut porter jusqu'à 4 chaînes de GAGs, qui peuvent être selon l'origine cellulaire des HS ou des CS, bien que la substitution par des HS soit plus fréquente (C.-P. Chen et al., 2008). Le core protéique d'environ 400 kDa est divisé en 5 domaines : le domaine I présente trois sites de liaisons pour des chaînes de GAGs, alors que le dernier site de liaison est localisé dans le domaine V. *Via* les nombreuses interactions qu'il engage avec de nombreux partenaires protéiques, il participe à l'assemblage et au maintien de l'intégrité des lames basales. De plus, il a été reporté qu'il avait également un rôle crucial dans les processus d'adhérence, de prolifération et d'angiogenèse, ces activités étant principalement liées à sa fonction de réservoir bioactif pour de nombreux facteurs de croissance qu'ils protègent de la dénaturation ou de la protéolyse (Iozzo, 2005; Whitelock et al., 2008).

L'agrine est un protéoglycane hautement glycosylé qui possède trois sites d'insertion pour des chaînes HS. Elle présente, comme son homologue le perlécan, une organisation multimodulaire. Elle est principalement retrouvée dans différentes régions du cerveau, notamment dans les zones riches en neurones et dans les lames basales microvasculaires. Sa présence a également été relatée dans les reins, les poumons, le foie et la glande thyroïdienne. Hormis ses fonctions d'organisation des lames basales, l'agrine participe à d'autres processus biologiques. Il a notamment été décrit qu'elle intervient dans la différenciation post-synaptique

en modulant l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine. Elle participe également à la réponse immunitaire adaptative en modulant l'activation des lymphocytes T au niveau des synapses immunologiques (Bezakova et al., 2003; Daniels, 2012; Jury et al., 2010) (Figure 7).

Le bamacan, contrairement aux protéoglycanes précédents, ne peut être substitué que par des chaînes CS (Iozzo, 1998). Sa présence a été décrite dans la plupart des lames basales où il aurait un rôle stabilisateur (Wu et al., 1997). De plus, il appartient à la famille des SMC (*Structural Maintenance of Chromosome*), protéines impliquées dans l'assemblage de complexes multimériques nucléaires. Il a d'ailleurs été suggéré que le bamacan jouerait un rôle dans ce processus (Ghiselli et al., 2000).

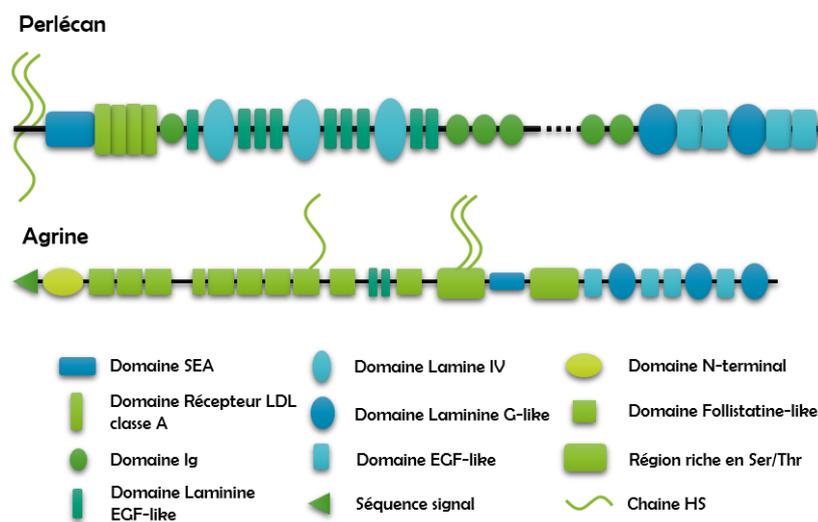


Figure 7: Représentation schématique du perlécan et de l'agrine

Les collagènes XV et XVIII appartiennent à la sous-famille des multiplexines. Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine central adoptant une structure en triple hélice contenant des séquences non-collagéniques. Le collagène XVIII porte préférentiellement des chaînes HS bien qu'il puisse dans certaines conditions être substitué par des chaînes CS (Dong et al., 2003). En revanche, le collagène XV ne peut être modifié que par des chaînes CS (Li et al., 2000). L'expression de ces deux protéoglycanes est ubiquitaire, on les retrouve dans la plupart des lames basales, où ils ont un rôle établi dans l'organisation structurale de ces compartiments et servent de lien avec les matrices sous-jacentes (Iozzo, 2005). En revanche, peu de choses sont connues sur le rôle des chaînes de GAGs, même s'il a été suggéré qu'elles participent à la régulation d'activité de facteurs de croissance ou aux mécanismes d'adhérence cellulaire (van Horssen et al., 2002).

2.2.4. Les protéoglycanes circulants

Le M-CSF-1 (*Macrophage colony-stimulating factor 1*) (ou PG-100) est un protéoglycane de 106 kDa avec une unique chaîne CS. Il est issu de l'épissage alternatif du gène codant pour le M-CSF. En effet, cette cytokine peut être produite sous 3 formes différentes: une forme membranaire (csCSF-1), une glycoprotéine sécrétée (sgCSF-1) ou un protéoglycane sécrété (spCSF-1) (Nandi, 2006). La forme protéoglycane est principalement sécrétée par les monocytes/macrophages, et dans une moindre mesure par les cellules endothéliales, les ostéoblastes et les fibroblastes (Chang et al., 1998). Bien qu'il ait été suggéré que cette forme puisse servir de forme de stockage de la cytokine, la chaîne CS étant capable d'interagir avec des molécules des matrices extracellulaires, son rôle précis n'est pas encore clairement élucidé (Stanley et al., 2014). Des travaux réalisés avec des souris n'exprimant que l'une des trois formes de M-CSF ont par contre démontré que chacune avait des fonctions différentes, probablement liées à leur localisation différente et à leur capacité différente à activer leur récepteur (Nandi, 2006).

La bikunine, nommée ainsi à cause de ses deux domaines inhibiteurs de protéases de type Kunitz, présente une seule chaîne CS dans la partie Nt de la protéine (Pugia et al., 2007). La bikunine est un protéoglycane atypique puisque la partie protéique est produite sous forme d'un précurseur polypeptidique contenant à la fois le core protéique de la bikunine et l' α 1-microglobuline. La chaîne CS est ajoutée sur ce précurseur par une liaison covalente sur un ou deux polypeptides appelés respectivement chaîne lourde 3 ou chaînes lourdes 1 et 2 (Zhuo et al., 2002). Cette liaison engage le carbone- α de l'acide aminé Ct des chaînes lourdes et un résidu non sulfaté de GalNAc. Ce genre de liaison est rare chez les GAGs et aurait pour rôle de permettre la protéolyse du précurseur dans les vésicules de sécrétion, ce qui libère l' α 1-microglobuline d'un côté et la bikunine de l'autre. Dans 90% des cas, la bikunine est liée avec la ou les chaînes lourdes pour former des complexes nommés pré- α -inhibitor (bikunine + chaîne lourde 3) et inter- α -inhibitor (bikunine + chaîne lourde 1 + chaîne lourde 2), ce dernier étant le plus représenté. De nombreuses fonctions ont été associées à la bikunine. Elle peut inhiber l'action de plusieurs protéases et ainsi prévenir le processus métastatique des cellules tumorales. Elle est aussi capable d'inhiber l'action du LPS (Lipopolysaccharide) et ainsi réduire la sécrétion de TNF- α (Kobayashi, 2006).

L'endocan est un protéoglycane soluble de 50 kDa qui porte une unique chaîne DS (Sarrazin et al., 2006). Son nom provient du fait qu'il est principalement sécrété par les cellules endothéliales. Cependant d'autres types cellulaires, comme les adipocytes, peuvent être à l'origine de sa production (Wellner et al., 2003). L'endocan est un protéoglycane particulier par

plusieurs aspects. Outre le fait qu'il soit exclusivement retrouvé dans la circulation, sa taille est relativement faible et la chaîne DS présente des caractéristiques structurales particulières, avec une forte proportion de disaccharides non-sulfatés et di-sulfatés, alors que les DS chez l'Homme ont majoritairement des disaccharides monosulfatés (Sarrazin et al., 2010). Ses fonctions précises sont assez mal définies mais de nombreuses études ont montré qu'il est surexprimé dans plusieurs types de cancers, l'obésité ou en conditions inflammatoires. En outre, il semblerait que la chaîne DS porté par l'endocan ait une grande importance pour son activité biologique (Delehedde et al., 2013; Sarrazin et al., 2006).

2.3. La serglycine, un protéoglycane intracellulaire

A l'inverse des protéoglycanes extracellulaires, la recherche sur leurs homologues intracellulaires a suscité moins d'intérêt. Le seul membre décrit de cette sous-famille est la serglycine. Bien que sa séquence ait été la première clonée parmi la famille des protéoglycanes, peu de choses sont connues sur ses fonctions.

La serglycine tire son appellation de sa séquence protéique contenant des répétitions de sérine et de glycine. Elle est exprimée par toutes les cellules hématopoïétiques, où on la retrouve stockée dans les granules de sécrétion avec d'autres molécules bioactives, et sécrétée après activation des cellules. Cependant, sa présence a été rapportée dans d'autres types cellulaires tels que les chondrocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes ainsi que dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Meen et al., 2011; Schick, 2010; Theocharis et al., 2006). Le type et le taux de sulfatation des chaînes de GAGs sont dépendants du type cellulaire (Korpetinou et al., 2014). Par exemple, les mastocytes produisent la serglycine portant des chaînes d'héparine ou de type CS-E alors que les autres leucocytes produisent plutôt des chaînes de type CS-A (Katsumi, 1974; Stevens et al., 1988). En outre, les motifs de sulfatation retrouvés sur les GAGs de la serglycine subissent de fortes modifications lors de la différenciation des monocytes en macrophages, avec des chaînes de type CS-A dans les monocytes et des chaînes CS-E dans les macrophages (Kolset et al., 1983).

La serglycine interagit avec de nombreux partenaires présents dans les granules de sécrétion, tels que des enzymes protéolytiques, des chimiokines, des cytokines, des facteurs de croissance. Elle régule la sécrétion de ces facteurs et potentialise leur activité en les protégeant et les accompagnant vers leurs cibles spécifiques (Pejler et al., 2009). Ainsi, la serglycine participerait à différents processus physiopathologiques impliqués dans les réponses inflammatoires et immunes ainsi que dans la tumorigenèse (Kolset et al., 2011; Li et al., 2011;

Scully et al., 2012). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents ainsi que la participation des chaînes de GAGs dans ces processus restent peu connus.

2.4. Les protéoglycanes membranaires

Deux groupes de protéoglycanes membranaires peuvent être distingués : les membres du premier groupe contiennent un domaine transmembranaire alors que ceux du second groupe sont fixés *via* une ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol). Les protéoglycanes transmembranaires sont représentés en majorité par la famille des syndécans et les variants du CD44, mais ce groupe comprend également d'autres membres moins représentés, tels que le bétaglycan, le neuroglycan C, le NG2 (*neuron-glia antigen 2*), la neuropiline 1, l'intégrine $\alpha 5$ - $\beta 1$ et le RPTP- β/ζ (*Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase beta/zeta*). Le second groupe est majoritairement représenté par la famille des glypicans, à laquelle on peut rajouter une isoforme du brévican.

2.4.1. Les syndécans

Les syndécans comptent 4 membres : le syndécane-1, le syndécane-2 ou fibroglycan, le syndécane-3 ou N-syndécane et le syndécane-4 ou amphiglycan/ryudocan (Figure 8). Les cores protéiques sont produits à partir de 4 gènes différents chez les vertébrés. Les produits de ces gènes sont des protéines transmembranaires de 20 à 45 kDa qui présentent une topologie de type I et une organisation structurale en 3 domaines : cytoplasmique, transmembranaire et extracellulaire (Bernfield et al., 1999; Rapraeger, 2001; Tkachenko et al., 2005). Le domaine cytoplasmique est constitué de trois régions distinctes nommées C1, V et C2 : la région C1 est très conservée dans tous les syndécans et se lie au cytosquelette d'actine ; la région V, comme son nom l'indique, présente une taille et une composition variable et est donc spécifique de chaque syndécane ; la région C2 est conservée dans tous les syndécans et peut lier des protéines à domaine PDZ (CASK, synectine, synténine, synbindine) (Alexopoulou et al., 2007). Le domaine transmembranaire, quant à lui, est très conservé entre les syndécans. Il est constitué d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage membranaire. Il serait aussi impliqué dans l'oligomérisation des syndécans. Enfin, le domaine extracellulaire est très variable entre les différents syndécans. Il contient des séquences Ser-Gly consensus impliquées dans la liaison des GAGs ainsi que des séquences spécifiques reconnues par des protéases. Ainsi, les syndécans peuvent exister sous forme soluble suite à leur clivage protéolytique. Ce clivage, appelé « shedding », est un processus hautement régulé qui fait intervenir plusieurs

types de protéases telles que la thrombine, la plasmine, l'élastase ou encore les MMPs (*Matrix Metalloproteinase*) (Choi et al., 2010).

Tous les syndécans portent des chaînes HS. De plus, les syndécans-1 et -3 peuvent porter des chaînes CS localisées sur les sites de glycosylation les plus proches de la membrane plasmique (Ueno et al., 2001). Les GAGs jouent un rôle prépondérant dans l'activité des syndécans car ils interagissent avec de nombreux facteurs extracellulaires. De manière générale, les syndécans sont impliqués dans des processus biologiques reliés aux interactions cellules-cellules et cellules-matrices : migration, prolifération et différenciation cellulaire. Cependant, leur expression est sujette à des variations spatiales et temporelles, ce qui leur confère également des fonctions particulières. En effet, bien que l'expression des syndécans soit ubiquitaire et que l'on retrouve au moins l'un d'entre eux sur pratiquement tous les types de cellules, leur niveau d'expression est très régulé en fonction du type cellulaire et de l'environnement (Alexopoulou et al., 2007).

Le syndécan-1 est fortement exprimé par les cellules épithéliales, endothéliales, par différentes lignées leucocytaires : cellules pré-B, plasmocytes, macrophages et cellules souches hématopoïétiques, ainsi que par de nombreux types de cellules malignes (Alexopoulou et al., 2007). De ce fait, il joue un rôle dans les interactions entre cellules endothéliales et leucocytes. Bien que son rôle dans ce phénomène soit encore à préciser, son absence entraîne une augmentation de l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium (Götte et al., 2005). Le syndécan-1 est aussi impliqué dans de nombreux autres processus biologiques tels que la clairance des lipoprotéines, la fixation et l'internalisation d'agents pathogènes, la formation de complexes de signalisation ou encore le remodelage des matrices extracellulaires (Teng et al., 2012). Son expression est très variable en fonction du type de cancers. Ainsi, il est surexprimé dans les myélomes multiples, les adénocarcinomes mammaires, alors que son expression diminue dans les tumeurs mésoenchymateuses. Il jouerait un rôle prépondérant dans la tumorigenèse en influant sur la prolifération des cellules cancéreuses, l'apoptose, l'angiogenèse et le processus métastatique (Barbouri et al., 2014; Teng et al., 2012).

Le syndécan-2 est principalement exprimé par les cellules mésoenchymateuses, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Il est également retrouvé dans les cellules neuronales et dans certains types de cellules tumorales où il peut être surexprimé (Essner et al., 2006). Outre ses fonctions dans l'interaction des cellules avec les matrices extracellulaires, il serait particulièrement impliqué dans les phénomènes d'angiogenèse et de vascularisation, comme le démontre une étude invalidant le syndécan-2 dans des cellules endothéliales de souris (Fears et al., 2006). De plus, il peut participer aux complexes de signalisation de plusieurs facteurs de

croissance (FGF-2, EGF, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), TGF- β family) (Chen et al., 2004; Clasper et al., 1999). Enfin, il a été impliqué dans la progression de plusieurs types de cancers et particulièrement celui du colon, où il favorise la migration et la survie des cellules cancéreuses (Barbouri et al., 2014; Vicente et al., 2013).

Le syndécan-3 est principalement retrouvé dans le système nerveux. Bien que ses fonctions restent encore mal connues, il a été démontré qu'il était un co-récepteur de nombreux médiateurs intercellulaires tels que l'AgRP (*Agouti-Related Protein*), HB-GAM (*Heparin-Binding Growth-Associated Molecules*), le GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*) et Notch *via* des interactions avec les GAGs (Bespalov et al., 2011; Pisconti et al., 2010; Reizes et al., 2003). Toutefois, il ne semble impliqué dans aucun type de cancer, contrairement aux autres membres de cette famille (Barbouri et al., 2014).

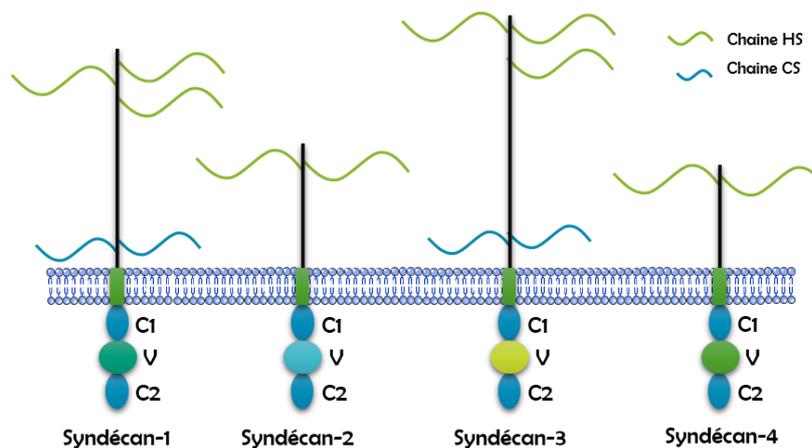


Figure 8: Représentation schématique des membres de la famille des syndécans.

Le syndécan-4 est exprimé de manière ubiquitaire mais à un niveau plus faible que ses homologues (Bernfield et al., 1999; Elfenbein et al., 2013). Il est le seul syndécan retrouvé au niveau des plaques focales d'adhérence, et a un rôle important dans les interactions cellules-matrices et dans la réorganisation du cytosquelette (Woods et al., 2001). Le domaine cytoplasmique interagit avec des molécules de signalisation ou des protéines de structures, telles que CASK, FAK, le syndesmos et la paxilline, *Via* sa région V, il est également capable de fixer le PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) et ainsi d'activer les PKC- α (*Protein Kinase C- α*) (Simons et al., 2001). Ainsi, le syndécan-4 participe à la formation de complexes macromoléculaires incluant des intégrines nécessaires à la mise en place des plaques focales d'adhérence (Saoncella et al., 1999). *Via* ses chaînes HS, il est également impliqué dans la fixation de nombreux facteurs de croissance, et a donc une activité de co-récepteur. En outre, il a été démontré que ces interactions pouvaient conduire à son oligomérisation et à sa localisation

dans les radeaux lipidiques, favorisant ainsi certaines voies de signalisation intracellulaires (Tkachenko et al., 2005).

2.4.2. Les variants du CD44

Plusieurs formes de CD44 peuvent être produites, résultant d'un mécanisme d'épissage alternatif au niveau de 10 exons variables (v1 à v10) situés dans le gène codant pour ce protéoglycane. Les produits de ce gène peuvent ensuite subir de nombreuses modifications post-traductionnelles amplifiant ainsi la diversité des variants CD44 (Goodison et al., 1999). Toutes les isoformes sont substituées par des chaînes CS et modifiées par *N*- et *O*-glycosylation. En revanche, seuls les variants produits *via* l'exon v3 portent des chaînes HS (Ponta et al., 2003). L'isoforme la plus répandue, exprimée dans la majorité des tissus, correspond à la forme courte, pour laquelle aucun des 10 exons variables n'est retenu. L'expression des autres isoformes est en revanche finement régulée en fonction du type cellulaire (Figure 9).

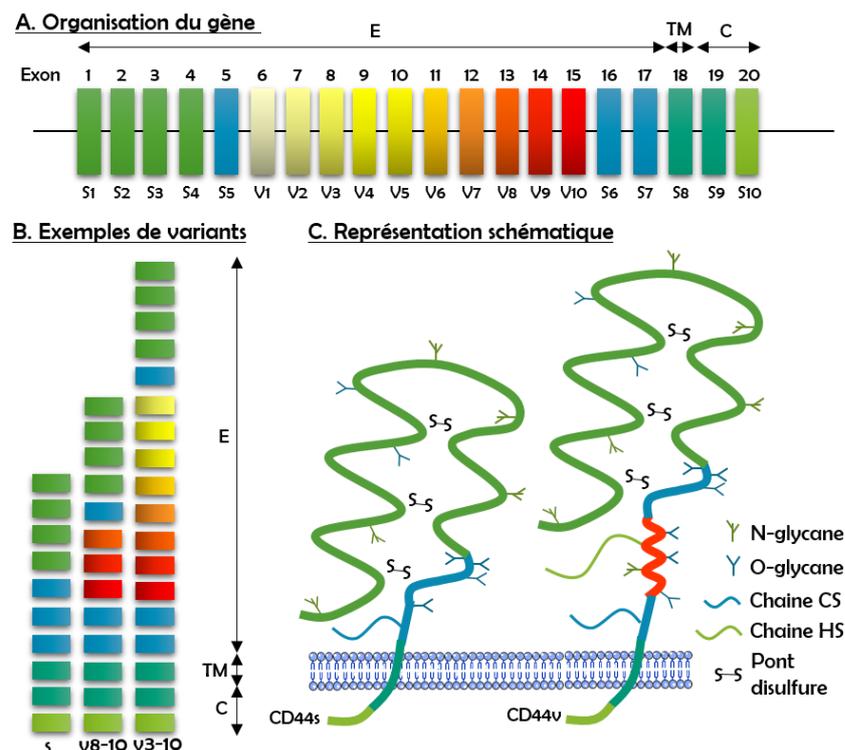


Figure 9: Organisation structurale du gène et des protéines CD44. (A) Organisation du gène avec les exons présents dans tous les ARNm et les protéines CD44 (S) et les exons variables (V) présents uniquement dans certains variants, et sélectionnés par épissage alternatif. (B) Exemples d'épissages alternatifs conduisant à différents variants. (C) Représentation schématique des formes standard (CD44s) et variables (CD44v) du CD44. (E: Extracellulaire ; TM: Transmembranaire ; C: Cytoplasmique) (d'après (Zöller, 2011))

Comme les syndécans, les isoformes du CD44 sont composés de trois domaines: extracellulaires, transmembranaire et cytoplasmique. Le domaine extracellulaire contient deux régions distinctes: la première située à l'extrémité Nt correspond à la région d'interaction avec l'AH ; la seconde, plus proche de la membrane plasmique, contient la zone codée par les exons variables ainsi que les sites d'ancrage des GAGs. Les domaines transmembranaires et cytoplasmiques, quant à eux, sont très conservés. Certaines séquences contenues dans le domaine cytoplasmique peuvent être phosphorylées et recruter des protéines du cytosquelette (Isacke et al., 2002).

Les variants du CD44 sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que l'assemblage des matrices extracellulaires, l'activation et la domiciliation des lymphocytes, l'hématopoïèse, la migration et l'adhérence cellulaire ainsi que l'invasion tumorale. Ces rôles résultent en général de l'interaction entre le CD44 et l'AH, dont il est le principal récepteur. Cependant, d'autres mécanismes moléculaires impliquant les GAGs du CD44 ont été décrits (Martin et al., 2003; Ponta et al., 2003). Certains variants peuvent par exemple fixer des facteurs de croissance *via* leur chaînes HS et remplir des fonctions de co-récepteur en modulant l'activité de récepteurs tyrosine kinase (Bennett et al., 1995; van der Voort et al., 2000, 1999). De plus, il a été suggéré que la surexpression de certaines isoformes serait liée à l'agressivité de plusieurs types de cancers (Prochazka et al., 2014).

2.4.3. Les autres protéoglycanes transmembranaires

Le bétaglycan, aussi connu pour être le récepteur de type III du TGF- β , est un protéoglycane substitué par des chaînes HS et CS. La première fonction qui lui a été attribuée est un rôle dans la présentation du TGF- β à ses récepteurs sérine/thréonine kinases. Il a ensuite été montré que le bétaglycan participe à la fixation d'autres membres de la famille du TGF- β (K. A. Lewis et al., 2000). Le bétaglycan est largement exprimé par les cellules mésenchymateuses, épithéliales et neuronales. En revanche, son expression est largement diminuée dans de nombreux types de cancers. Cela conduit à une sensibilité réduite pour le TGF- β et favorise la croissance des cellules cancéreuses (Bilandzic et al., 2009; Hempel et al., 2008). Il a d'ailleurs été mis en évidence que la perte d'expression du bétaglycan pouvait être due à des mutations ou à des modifications épigénétiques (Sharifi et al., 2007). Un autre mécanisme conduisant à la perte du bétaglycan est le phénomène de shedding, qui peut subvenir dans des conditions inflammatoires et dans certains types de cancers (Bernabeu et al., 2009).

Le neuroglycan C (NGC) est un protéoglycane portant une chaîne CS et exprimé de manière prédominante à la surface des neurones (Oohira et al., 2004). Il possède un core

protéique organisé en cinq domaines distincts : un domaine Nt portant la chaîne CS, un domaine riche en acides aminés acides, un domaine riche en cystéine contenant un module EGF-like, un domaine transmembranaire et un domaine Ct cytoplasmique (Watanabe et al., 1995). Le NGC n'est pas toujours exprimé sous forme protéoglycane, puisque des formes sans chaîne CS sont retrouvées dans la rétine et le cervelet (Inatani et al., 2000). Ainsi, les cellules de Purkinje (neurones GABAergiques situés dans le cervelet) arborent le NGC sous sa forme protéoglycane lorsqu'elles sont immatures, puis expriment une forme déglycosylée après différenciation. Il a été suggéré que la disparition de la chaîne CS pouvait jouer un rôle dans les connexions que ces neurones engagent avec les autres types de cellules présentes dans le cervelet. En outre, il a été montré que la présence et la structure de la chaîne CS n'étaient pas seulement modifiées en fonction du stade de développement mais également en fonction du type cellulaire (Aono et al., 2004). Le NGC serait également impliqué dans la modulation de l'activité des récepteurs ErbB, faisant de ce protéoglycane un membre des neurégulines. Grâce à la présence de son domaine EGF-like, le NGC est en effet capable de se fixer sur ErbB3 et de transactiver ErbB2, induisant ainsi la prolifération cellulaire. Toutefois, ce rôle n'est pas dépendant de la présence de la chaîne CS (Kinugasa et al., 2004).

Le NG2 est un protéoglycane présentant une grande région extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Pantazaka et al., 2014). La région extracellulaire contient trois domaines distincts : un domaine composé de plusieurs modules LG (laminin G-type), un domaine contenant le site d'attachement de la chaîne CS et un domaine contenant des sites de *N*-glycosylation, de liaison pour certaines lectines et de clivage protéolytique. Le domaine cytoplasmique, quant à lui, contient des résidus de tyrosine pouvant être phosphorylés et permettant l'activation de PKC- α et de ERK1,2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*), ainsi que des séquences permettant de recruter des protéines à domaines PDZ et SH3 (Price et al., 2011). Comme le NGC, le NG2 peut être produit sans chaîne CS dans certaines conditions. Initialement mis en évidence dans le système nerveux central, sa présence a ensuite été reportée dans de nombreux autres types cellulaires. Ce protéoglycane a d'ailleurs été impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que la migration, l'angiogenèse, la cicatrisation et la progression tumorale. Il participe par exemple à la migration de cellules de gliome *via* son interaction avec les collagènes de type VI (Burg et al., 1997). Il peut interagir avec les complexes galectine-3/intégrine $\alpha3\beta1$ présents à la surface des cellules endothéliales, ce qui favorise l'angiogenèse (You et al., 2014). Il est également retrouvé co-localisé avec les intégrines $\alpha3\beta1$ à la surface de plusieurs types de cellules tumorales, où il jouerait alors un rôle de corécepteur pour les ligands des intégrines (Stallcup et al., 2008). L'invalidation de NG2

entraîne la diminution de la prolifération de cellules issues de mélanomes, indiquant qu'il pourrait être une cible thérapeutique dans certains cancers (J. Wang et al., 2011). Enfin, le NG2 est capable de fixer le FGF-2 de manière indépendante de la chaîne CS et modulerait l'activité du facteur de croissance (Cattaruzza et al., 2013).

Les intégrines sont une famille de protéines membranaires impliquées dans les mécanismes d'adhérence cellule-matrice. Elles participent à la signalisation intracellulaire et régulent la réorganisation du cytosquelette dans les cellules circulantes mais également dans de nombreux types de cellules métastatiques. A ce jour, 24 types d'intégrines ont été identifiés, toutes constituées de l'assemblage non-covalent d'une chaîne α et d'une chaîne β (Pantazaka et al., 2014). Il a été démontré que la glycosylation des chaînes d'intégrine joue un rôle important dans leur activité. Toutefois, peu de choses sont connues sur le type de glycosylation de ses molécules et sur leurs rôles associés (Janik et al., 2010). Pour l'heure, un seul type d'intégrine, $\alpha 5 \beta 1$, a été caractérisé comme étant un protéoglycane. Elle peut porter des chaînes HS et CS sur les deux sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$, ce qui pourrait influencer les interactions avec la fibronectine. De plus, il a été montré qu'en fonction du type cellulaire, les GAGs des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ varient en termes de taille et de sulfatation, mais le rôle biologique de ces modifications reste à élucider (Franco et al., 2009).

La neuropiline-1 est une protéine transmembranaire de 130 kDa présentant plusieurs domaines structuraux distincts : trois domaines extracellulaires, un domaine membranaire et une courte queue cytoplasmique (Pellet-Many et al., 2008). Le premier domaine extracellulaire situé à l'extrémité Nt présente une forte homologie avec certaines protéines du complément et permet la fixation de la sémaphorine 3A. Le second domaine est quant à lui homologue avec les facteurs de coagulation V et VII. Il participerait à la fixation du VEGF-A. Enfin, le dernier domaine participerait à la dimérisation de concert avec le domaine transmembranaire. La partie cytoplasmique possède une séquence capable de fixer les protéines à domaine PDZ. La neuropiline-1 peut subir différents types de glycosylation et il a été montré qu'elle est substituée par une chaîne HS ou CS. De plus, la taille et la sulfatation du GAG porté par la neuropiline-1 sont dépendantes du type cellulaire. Ainsi, les cellules endothéliales produisent des GAGs capables d'augmenter l'activité du VEGF-A en le présentant à son récepteur VEGFR-2 alors que les cellules musculaires lisses produisent des chaînes qui inhibent l'activité du même facteur de croissance (Shintani et al., 2006). Initialement identifiée comme le récepteur de la sémaphorine 3A et du VEGF-A, il a ensuite été montré que la neuropiline-1 joue aussi un rôle dans la fixation et l'activité du TGF- $\beta 1$ et du PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) (Ball et al., 2010; S. Cao et al., 2010; Y. Cao et al., 2010; Dhar et al., 2010; Glinka et al., 2008). Elle

aurait également un rôle prépondérant dans les interactions entre lymphocytes T et cellules dendritiques, en participant à la formation des synapses immunologiques (Tordjman et al., 2002).

Quatre isoformes de RPTP- β/ζ ont été identifiées, produites par épissage alternatif à partir d'un même gène. Les deux isoformes transmembranaires diffèrent par leur partie extracellulaire, la forme la plus longue contenant des sites d'attachement pour des CS alors que l'autre en est dépourvue. Les deux autres isoformes sont sécrétées et correspondent en fait aux parties extracellulaires des formes membranaires. L'isoforme sécrétée possédant des chaînes CS est aussi appelé phosphacan (Maurel et al., 1994). Les isoformes membranaires possèdent un domaine cytoplasmique contenant deux sites phosphatase en tandem et une séquence de fixation des protéines PDZ (Mikelis et al., 2007). Elles sont fortement exprimées dans le cerveau, ainsi que dans de nombreuses lignées cellulaires endothéliales et tumorales (Mikelis et al., 2009; Polytarchou et al., 2009). Elles sont impliquées dans la croissance des neurites, l'adhérence cellulaire, la migration, l'angiogenèse et la tumorigenèse (Pantazaka et al., 2014), et servent de récepteurs fonctionnels pour la pléiotropine, modulant ainsi la migration cellulaire (Ulbricht et al., 2006). L'interaction entre le RPTP- β/ζ et la pléiotropine est fortement inhibée en présence CS-D et CS-E solubles, plus modérément par les CS-B et CS-C, alors que les CS-A n'ont aucun effet. Ces données suggèrent que les chaînes de CS portées par le RPTP- β/ζ doivent être fortement sulfatées pour assurer la fonction de récepteur pour la pléiotropine (Maeda et al., 1999). Des résultats similaires ont été obtenus avec la midkine et l'IL-34 (Interleukine-34), autres ligands de RPTP- β/ζ , confirmant l'importance des chaînes CS dans l'activité de ce récepteur (Muramatsu, 2002; Nandi et al., 2013).

2.4.4. Les protéoglycanes liés via une ancre GPI

Les glypicans sont des protéoglycanes liés à la surface plasmique *via* une ancre GPI. Six membres ont été décrits dans cette famille : le glypican-1, le glypican-2 ou cérébroglycan, le glypican-3 ou OCI-5, le glypican-4 ou K-glypican, le glypican-5 et enfin le glypican-6, tous codés par des gènes distincts (Figure 10). Tous portent des chaînes HS localisées à proximité de la membrane plasmique, à l'exception du glypican-5 qui peut également subir des modifications par des chaînes CS (Filmus et al., 2008).

La caractéristique partagée par tous les glypicans est la présence d'une ancre GPI permettant la liaison à la membrane plasmique. Ce type d'ancrage a déjà été décrit comme favorisant une localisation dans des microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques (*lipid rafts*), et permettant la formation de complexes multimoléculaires de signalisation

(Paulick et al., 2008). Les ancrés GPI permettraient également de diriger les protéines vers des voies d'endocytose spécifiques permettant le recyclage à la membrane plasmique (Cheng et al., 2002). Il a d'ailleurs été montré que le recyclage des glypicans est accompagné d'un remodelage des chaînes HS et d'une acylation de l'ancrage GPI, ce qui les rend insensibles aux lipases (Bernfield et al., 1999).

Les glypicans ont été impliqués dans de nombreux processus physiologiques, le plus souvent liés à la morphogénèse. A l'instar des syndécans, tous les glypicans ne sont pas exprimés au même moment et par les mêmes types de cellules, conférant à chaque membre de cette famille des fonctions particulières (Fransson et al., 2004).

Le glypican-1 est largement exprimé dans le système nerveux central chez l'embryon et de manière plus ubiquitaire chez l'adulte (Fransson et al., 2004). Initialement décrit comme impliqué dans la régulation de l'activité de facteurs de croissance et de morphogènes, d'autres fonctions lui ont été assignées, telles que l'internalisation des polyamines. En effet, l'entrée de ces molécules a été corrélée au recyclage des chaînes HS du glypican-1, qui s'accompagne d'une augmentation de la sulfatation des chaînes HS, créant ainsi plus de sites de liaison (Fico et al., 2011). D'un point de vue pathologique, le glypican-1 participerait à l'accumulation des plaques β -amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer (Watanabe et al., 2004) et aurait également un rôle dans plusieurs types de cancers, où il est surexprimé. *Via* son action sur les facteurs de croissance, il augmenterait la prolifération cellulaire (Yoneda et al., 2012).

Le glypican-2 est exclusivement exprimé lors de l'embryogenèse, principalement au niveau du système nerveux central (Fransson et al., 2004). Il aurait un rôle prépondérant dans l'orientation des axones en participant notamment à l'activité de la midkine sur les neurones (Kurosawa et al., 2001).

Le glypican-3 est exprimé de manière ubiquitaire chez l'embryon, mais son expression est réduite dans le système nerveux central chez l'adulte (Fransson et al., 2004). Comme les autres glypicans, il est impliqué dans l'activité de facteurs de croissance et de morphogènes, notamment IGF, FGF-2 et les protéines Wnt et Hedgehog (Dwivedi et al., 2013). Chez l'homme, une mutation sur le gène codant pour ce glypican est responsable du syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), se manifestant par des anomalies morphologiques et une croissance excessive dès la naissance (Cottreau et al., 2013). De plus, le glypican-3 a largement été impliqué dans plusieurs types de cancers. Son expression est très fortement induite dans les carcinomes hépatocellulaires et est corrélée avec un mauvais pronostic de survie (Filmus et al., 2013). Il pourrait d'ailleurs servir de marqueur tumoral dans d'autres types de cancers notamment les mélanomes et les cancers des ovaires (Filmus, 2001). Des anticorps dirigés

contre le glypican-3 ont été développés et permettent de réduire la prolifération des cellules tumorales. L'un d'entre eux est en phase I d'essai clinique pour son action sur les carcinomes hépatocellulaires (Feng et al., 2014).

Le glypican-4 est principalement exprimé lors de l'embryogenèse dans les reins et dans le cerveau. Chez l'adulte, son expression est assez large, avec une faible expression dans le système nerveux central (Fransson et al., 2004). Ses fonctions précises sont encore mal connues bien que, comme les autres glypicans, il ait été impliqué dans la fixation et l'activité de facteurs de croissance et de morphogènes (Dwivedi et al., 2013). De plus, il jouerait un rôle dans la sensibilité des cellules à l'insuline et participerait ainsi à la régulation métabolique (Tamori et al., 2013).

Le glypican-5, principalement exprimé dans le système nerveux central chez l'adulte, est également retrouvé dans les reins et le cerveau lors de l'embryogenèse (Fransson et al., 2004). Ses fonctions précises ne sont pas encore bien définies. Il est fortement exprimé dans les cancers pulmonaires non à petites cellules. Toutefois, son activité est controversée, puisque certaines études suggèrent qu'il agirait comme un suppresseur de métastase (Yang et al., 2013) alors que d'autres ont montré que sa surexpression est corrélée à un mauvais pronostic de survie (Li et al., 2013).

Le glypican-6 est exprimé dans les ovaires et les intestins chez l'adulte, mais présente une répartition plus large chez l'embryon (Fransson et al., 2004). Il participe à la régulation de l'activité de facteurs morphogènes, tels que les protéines Wnt. Son expression a également été corrélée aux propriétés migratrices des cellules issues de cancers du sein (Yiu et al., 2011).

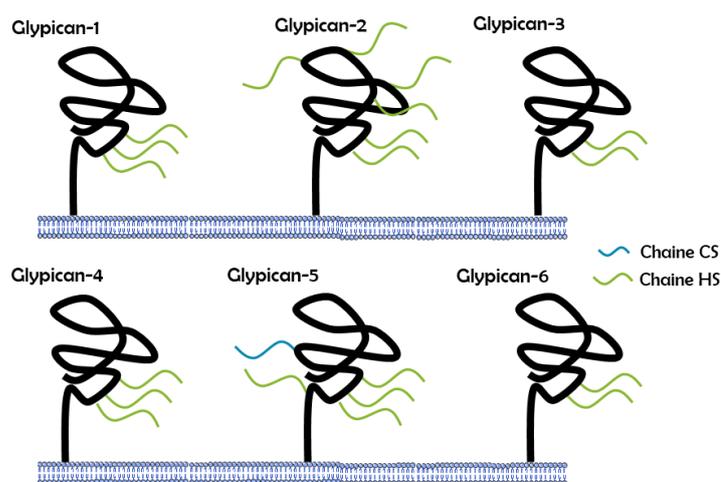


Figure 10: Représentation schématique des membres de la famille des glypicans. (d'après (Rosenberg et al., 1997))

Le brevican est le seul protéoglycane de la famille des hyalectanes à exister sous forme membranaire. Bien que majoritairement produit sous forme sécrétée, le brevican peut à l'issue d'un épissage alternatif être synthétisé sous une forme plus courte et modifiée par une ancre GPI. Ainsi, il reste lié à la membrane plasmique et peut servir de récepteur à l'AH. L'expression de cette isoforme membranaire est, comme celle de l'isoforme sécrétée, restreinte au système nerveux central (Frischknecht et al., 2012).

III. Biosynthèse des héparanes et chondroïtanes sulfates

3.1. Etape d'initiation de la biosynthèse

Comme la majorité des protéines membranaires et sécrétées, la biosynthèse des cores protéiques des protéoglycanes démarre dans le cytoplasme. Il y a ensuite translocation du polypeptide naissant dans la lumière du RE où il pourra se replier de manière à adopter sa structure tridimensionnelle (Silbert et al., 2002). L'ajout des chaînes HS et CS/DS débute dans le RE et se poursuit dans l'appareil de Golgi. Il n'existe pas de site consensus à proprement parler pour l'initiation de ce processus. Cependant, on retrouve les GAGs liés à des résidus de sérine, très souvent dans des motifs Ser-Gly.

La biosynthèse des HS, de l'héparine et des CS/DS est initiée par la formation de la même amorce tétrasaccharidique : $\text{GlcUA}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Xyl}(\beta 1)$, à partir des nucléotide-sucres UDP-Xyl, UDP-Gal et UDP-GlcUA. Le xylose est transféré sur la fonction hydroxyle de la sérine par les xylosyl-transférase I ou II (XylT1, XylT2). Les galactosyl-transférases I (B4GalT7) et II (B3GalT6) ajoutent ensuite de manière successive les deux résidus de Gal, puis la glucuronosyl-transférase I (B3GAT3) ajoute le résidu de GlcUA (Mikami et al., 2013b). Les enzymes impliquées dans ce processus sont toutes transmembranaires avec une topologie de type II.

L'amorce oligosaccharidique peut ensuite subir plusieurs types de modifications : phosphorylation du xylose en C2, sulfatations du premier résidu de galactose en C6 et du second résidu de galactose en C4 ou C6. Le rôle précis de ces modifications n'est pas complètement élucidé. Il a été toutefois suggéré qu'elles pourraient diriger la biosynthèse dans le choix du type de GAG polymérisé et/ou réguler le nombre de chaînes (Tone et al., 2008; Ueno et al., 2001). La phosphorylation du résidu de xylose, que l'on retrouve sur les deux types de GAGs, pourrait également servir de signal pour le transport et la sécrétion des protéoglycanes ou encore contrôler les modifications ultérieures des chaînes glycaniques (Koike et al., 2009; Moses et al., 1999). Quant aux sulfatations des résidus de Gal, elles pourraient être impliquées dans le

recyclage des protéoglycanes (Kitagawa et al., 1995; Lidholt et al., 1997). Il est aussi intéressant de noter que la phosphorylation du résidu de xylose n'a jamais été retrouvée de manière concomitante aux sulfatations des résidus Gal (Prydz et al., 2000).

3.2. Elongation et maturation des chaînes HS

3.2.1. Mécanisme général

Après la formation de l'amorce tétrasaccharidique, un résidu de GlcNAc est ajouté par une liaison (α 1-4) sur le résidu GlcUA de l'amorce. Cette réaction est catalysée par la famille des EXTL (*Exostosin-Like glycosyltransferase*) (EXTL1, EXTL2 et EXTL3), qui possèdent une activité *N*-acétylglucosaminyl- transférase (Sugahara et al., 2002). Plusieurs travaux ont montré qu'EXTL3 serait la principale enzyme impliquée dans ce processus *in vivo*. Toutefois, les invalidations d'EXTL1 et d'EXTL2 conduisent également à une réduction de la production de chaînes HS.

Le processus par lequel la biosynthèse d'une chaîne HS est initiée est encore mal connu. Il a été montré que la polymérisation se fait le plus souvent sur un motif Ser-Gly précédé d'acides aminés acides, alors que la biosynthèse de chaînes de type CS est beaucoup moins fréquente sur ce type de séquence (Esko et al., 1996). De même, les résidus hydrophobes proches de la séquence Ser-Gly pourraient augmenter les chances de greffer une chaîne HS. D'autres travaux ont suggéré que la présence de séquences protéiques pourtant éloignées du site d'attachement pouvaient influencer sur le type de chaîne, comme dans le cas des glypicans où il a été montré que le domaine globulaire extracellulaire a une forte incidence sur la nature des chaînes de GAGs greffées (Chen et al., 2001). Enfin, les modifications subies par l'amorce tétrasaccharidique pourraient contrôler le choix du type de chaînes ajoutées. La sulfatation des résidus Gal conduirait à la polymérisation de chaînes CS/DS, alors que l'ajout de chaînes HS se ferait par défaut en l'absence de ce type de modifications (Sugahara et al., 2002). Des travaux ont d'ailleurs montré que l'activité de EXTL1 est inhibée par la 4-*O*-sulfatation du résidu de Gal (Gulberti et al. 2005a; Gulberti et al. 2005b).

Une fois le premier résidu de GlcNAc lié à l'amorce tétrasaccharidique, la polymérisation des chaînes HS va se faire par addition successive de résidus GlcUA et GlcNAc. Ce processus est assuré par un complexe formé par les enzymes EXT1 et EXT2 (*Exostosin glycosyltransferase*), qui par leurs activités β 4GlcUAT et α 4GlcNAcT, vont construire le squelette polysaccharidique [GlcUA(β 1-4)GlcNAc(α 1-4)]_n (Sugahara et al., 2002). La longueur des chaînes, qui varie de 40 à 160 disaccharides dépend du type cellulaire, mais le processus de

terminaison reste à l'heure actuelle encore mal connue. La chaîne peut se terminer par l'un ou l'autre des résidus de GlcUA ou de GlcNAc.

La maturation des HS est un processus complexe, au cours duquel le polymère non sulfaté sert de précurseur pour une série de modifications séquentielles. Ce processus se déroule en cinq étapes : (i) une réaction de *N*-déacétylation très souvent suivie d'une *N*-sulfatation de certains résidus de GlcNAc, (ii) une C5-épimérisation des résidus de GlcUA liés du côté réducteur aux GlcNS, ce qui conduit à la formation de résidus d'IdoUA, (iii) la 2-*O*-sulfatation partielle des résidus d'IdoUA formés et plus rarement de GlcUA, (iv) l'ajout de groupements sulfates en C6 et (v) occasionnellement en C3 sur les résidus GlcN.

Quatre familles de sulfotransférases : *N*-déacétylases/*N*-sulfotransférases (NDSTs), 2-*O*-, 6-*O*- et 3-*O*-sulfotransférases (2-, 6- et 3-OSTs), ainsi qu'une C5-épimérase participent à la maturation des HS. Les sulfotransférases catalysent le transfert de groupements sulfates à partir du donneur de sulfate universel, le phospho-adénosyl phosphosulfate (PAPS), sur le polysaccharide naissant. L'ensemble de ces enzymes ont été purifiées et clonées. Alors qu'il n'existe qu'une 2-OST et une C5-épimérase, quatre NDSTs, trois 6-OSTs et sept 3-OSTs ont été caractérisées. Ces enzymes, dont l'expression est dépendante du type cellulaire, possèdent des activités et des spécificités de substrat différentes *in vitro*, ce qui confère une grande hétérogénéité structurale aux HS et offre ainsi un large éventail de motifs de fixation pour les ligands protéiques (Kusche-Gullberg et al., 2003; Lindahl et al., 2009) (Figure 11).

3.2.2. Les HS polymérase

La polymérisation des chaînes HS est catalysée par les EXTs (Exostosines), dont il existe cinq membres : EXT1, EXT2, EXTL1, EXTL2 et EXTL3. Les cinq membres de cette famille ont été clonés et l'analyse des séquences primaires a montré qu'elles partageaient de nombreuses caractéristiques suggérant des fonctions proches et une origine commune (Zak et al., 2002).

EXT1 et EXT2 sont des protéines transmembranaires de type II de 746 et 718 acides aminés qui présentent un domaine transmembranaire de 17 acides aminés et un court domaine cytoplasmique situé en Nt. Elles partagent également plusieurs autres domaines ainsi que des séquences riches en cystéine dont l'espacement est parfaitement conservé, ce qui suggère qu'elles présentent une conformation similaire. Parmi les domaines conservés, EXT1 et EXT2 présentent des motifs DXD généralement impliqués dans la fixation des UDP-sucres et nécessaires à l'activité glycosyl-transférase (J. Li et al., 2001). Les fonctions des autres domaines conservés ne sont pas encore clairement déterminées.

EXT1 et EXT2 forment un complexe protéique dans l'appareil de Golgi, et cette association est indispensable pour assurer leur rôle biologique (Kobayashi et al., 2000b; McCormick et al., 2000). EXT1 possède les deux activités β 4GlcUAT (GlcUA-TII) et α 4GlcNAcT (GlcNAc-TII). Ainsi, les cellules CHO psgD déficientes dans la synthèse de HS n'expriment plus EXT1 et aucune des deux activités de polymérisation n'est détectable dans les cellules (Wei et al., 2000). En outre, une forme recombinante de EXT1 possède les deux activités *in vitro* et est capable à elle seule de polymériser des chaînes HS (Senay et al., 2000). Les sites catalytiques impliqués dans les deux activités ne sont pas localisés dans les mêmes domaines d'EXT1. Le site portant l'activité GlcUAT a été identifié et est situé dans la région Nt de la protéine, comme le montrent des études de mutations au niveau de cette région (McCormick et al., 2000; Wei et al., 2000). Par contre, le site portant l'activité GlcNAcT n'est toujours pas identifié. Comme EXT1, EXT2 possède les deux activités enzymatiques *in vitro*. Cependant, les régions portant les sites catalytiques n'ont toujours pas été identifiées. Bien que les deux polymérases possèdent les mêmes activités, elles n'ont pas de fonction redondante dans la polymérisation des HS. Il a en effet été montré que la surexpression de EXT2 a peu d'effet sur les activités enzymatiques mesurées (Lind et al., 1998). De même, la transfection de EXT2 dans des cellules déficientes en EXT1 ne permet pas de restaurer la synthèse des HS (McCormick et al., 2000; Wei et al., 2000). Par contre, la co-transfection des deux enzymes augmente de manière significative les deux activités enzymatiques dans la cellule et la synthèse des HS.

Les trois autres membres de la famille EXT présentent de fortes homologies de séquence avec EXT1 et EXT2. Comme attendu, EXTL3 (919 AA) et EXTL1 (676 AA) sont capables de transférer des résidus α -GlcNAc *in vitro*. Bien que EXTL2 (330 AA) soit également pourvue de cette activité, il a été montré qu'elle était beaucoup plus efficace dans le transfert d' α -GalNAc, ce qui rend son rôle biologique incertain (Kitagawa et al., 1999). La seule enzyme de cette famille dont la structure tridimensionnelle a été résolue est EXTL2, ce qui a permis de lui attribuer une structure de type GT-A, commune à de nombreuses enzymes présentant des motifs DXD (Pedersen et al., 2003). La réaction enzymatique qu'elle catalyse se produit avec rétention de la configuration du glycoside donneur, ce qui suggère, sur la base de leur homologie de séquence, que les autres membres de la famille EXT possèdent un mécanisme d'action similaire.

Le rôle d'EXTL1 n'est pas encore clairement élucidé. Bien qu'elle possède une activité GlcNAcT-II, des études complémentaires sont requises pour élucider le rôle précis de cette enzyme dans la biosynthèse des HS (Kim et al., 2001). Il se pourrait d'ailleurs que EXTL1 ne

soit pas indispensable à la biosynthèse des HS, car ses orthologues ne sont pas présents dans des organismes plus simples comme *C. elegans* ou *D. melanogaster* capables de synthétiser des HS (Zak et al., 2002). De même, le rôle d'EXTL2 reste assez énigmatique. Initialement identifiée comme une α -GalNAc transférase capable de transférer un résidu de GalNAc sur l'amorce tétrasaccharidique (Kitagawa et al., 1995), le produit de la réaction (GalNAc α 1-3GlcUA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl-) n'a jamais été détecté dans des protéoglycanes natifs. Il a toutefois été détecté dans des oligosaccharides synthétisés à partir de β -D-xylosides, qui agissent comme amorces artificiels pour la biosynthèse des GAGs (Salimath et al., 1995). Des études *in vitro* ont ensuite montré que EXTL2 possède également une faible activité α -GlcNAc-TI (Kitagawa et al., 1999). Enfin, le dernier membre de cette famille, EXTL3 apparaît comme étant une α -GlcNAcT efficace capable d'agir aussi bien sur l'amorce tétrasaccharidique (GlcNAc-TI) que sur les chaînes en cours de polymérisation (GlcNAc-TII) (Kim et al., 2001). De plus, il a été montré que ses activités enzymatiques sont nettement supérieures à celles d'EXTL1 et d'EXTL2. Ainsi, EXTL3 serait le meilleur candidat pour l'ajout du premier résidu de GlcNAc sur l'amorce tétrasaccharidique (GlcNAc-TI). De plus, il pourrait participer à la polymérisation des chaînes HS (GlcNAc-TII), bien qu'il n'existe pas encore de preuves directes de cette activité (Zak et al., 2002). Accessoirement à son activité dans la biosynthèse des HS, EXTL3 aurait d'autres activités biologiques. Dans les cellules β du pancréas, elle servirait de récepteur pour la protéine REG, un facteur de régénération tissulaire, et serait également impliqué dans la réponse NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) induite par le TNF- α (Kobayashi et al., 2000a; Mizuno et al., 2001). Cependant, les relations entre ces activités et la synthèse des HS ou l'activité GlcNAc-T ne sont pas connues.

Les cinq membres de la famille EXT sont exprimés de manière ubiquitaire dans les tissus, et peu de choses sont connues sur la régulation de leur expression. En revanche, des études ont montré qu'un dysfonctionnement de ces gènes, notamment ceux codant EXT1 et EXT2, est corrélié à l'HME (*Hereditary Multiple Exostoses*), une maladie autosomale dominante caractérisée par des excroissances osseuses (Zak et al., 2002).

3.2.3. Les N-déacétylases/N-sulfotransférases

La maturation du polysaccharide naissant est initiée par les NDSTs. Ces enzymes bifonctionnelles sont les premières à agir sur le précurseur, et leur action constitue un prérequis pour les réactions suivantes. Les HS sont les seuls GAGs à pouvoir subir ce type de modifications (Grobe et al., 2002b; Kjellén, 2003).

Quatre NDSTs ont été identifiées chez les vertébrés, purifiées, clonées et caractérisées. Les quatre membres de cette famille sont codés par des gènes distincts, qui présentent une organisation génomique similaire. Les séquences peptidiques des NDSTs présentent de fortes homologues, ce qui laisse suggérer qu'elles sont issues d'un gène ancestral. (Aikawa et al., 2001; Dixon et al., 1995; Orellana et al., 1994).

Les NDSTs sont localisées dans l'appareil de Golgi et présentent une topologie similaire (Pinhal et al., 2001). Ce sont des protéines transmembranaires de type II possédant un court domaine cytoplasmique Nt (12 à 18 AA) suivi d'une région transmembranaire, puis d'une région « tige » constituée d'environ 40 AA, et enfin d'un domaine globulaire Ct portant les activités catalytiques. Leur localisation golgienne est dictée par leurs domaines transmembranaires et « tiges » (Nilsson et al., 1994). Toutefois, des différences dans leurs séquences ont été identifiées dans ces régions, ce qui suggère que les NDSTs pourraient être localisées dans différents compartiments golgiens.

La bifonctionnalité de cette famille d'enzyme s'explique par la présence de deux domaines distincts portant les sites catalytiques, responsables respectivement de la *N*-déacétylation et de la *N*-sulfatation des GlcNAc (Aikawa et al., 2001; Bengtsson et al., 2003). L'utilisation de formes tronquées de ces enzymes a d'ailleurs permis de montrer que l'activité *N*-déacétylase est localisée dans le domaine Ct et que l'activité *N*-sulfotransférase est portée par un site distinct localisé lui-aussi dans la région Ct (Duncan et al., 2006). Seul le domaine *N*-sulfotransférase de la NDST1 (882 AA) humaine a été cristallisé à ce jour. Il est composé de cinq brins β parallèles reliés entre eux par des hélices α et possède une structure sphérique présentant un sillon ouvert capable d'accueillir un hexasaccharide. Deux sites de fixation pour le PAPS ont été identifiés : le site 5'PSB (*5'-phosphosulfate binding motif*) et le site 3'PB (*3'-phosphate binding motif*). Ces deux sites sont d'ailleurs partagés par de nombreuses autres sulfotransférases (Kakuta et al., 1998). Certains résidus d'acides aminés ont été caractérisés comme étant essentiels à l'activité catalytique de cette enzyme. Ainsi la Lys-614, qui est aussi conservée dans d'autres glucosaminyl sulfotransférases, joue un rôle critique dans la catalyse (Sueyoshi et al., 1998). De même, la Lys-833 et l'His-716 ont un rôle important dans ce processus (Gesteira et al., 2013). Ces résidus sont impliqués dans la fixation du polysaccharide mais également dans l'activité catalytique de la NDST1. D'autres résidus ont été impliqués dans la fixation du polysaccharide grâce à des études de mutagenèse dirigée (Kakuta et al., 2003). Sur la base de cette structure cristalline, des études de modélisation moléculaires ont été entreprises et ont permis de mettre en évidence des différences de charge et de forme au sein

du domaine catalytique de chaque NDST, laissant suggérer qu'elles possèdent des spécificités de substrat différentes (Aikawa et al., 2001).

Les premières études portant sur l'activité des NDSTs dans la maturation des HS ont été réalisées sur des cellules CHO déficientes en NDST1 (CHO pgsE-606). Plusieurs équipes ont montré que ces cellules produisent des HS faiblement *N*- et *O*-sulfatés en comparaison avec les cellules CHO sauvages (Bame et al., 1994). Il en a été conclu que les *N*-sulfates ajoutés au sein de la chaîne HS dictaient également le taux d'*O*-sulfatation. De ce fait, la réaction de *N*-déacétylation/*N*-sulfatation apparaît comme une étape critique de la maturation des HS.

In vitro, toutes les NDSTs possèdent les deux activités catalytiques. Toutefois, des différences existent au niveau de leurs substrats accepteurs ainsi que dans le ratio entre les activités *N*-sulfotransférase / *N*-déacétylase (Aikawa et al., 2001). Alors que la NDST3 (873 AA) possède une activité *N*-déacétylase élevée et une activité *N*-sulfotransférase plutôt faible, l'inverse est observé pour la NDST4 (872 AA). Les NDST1 et la NDST2 (883 AA), quant à elles, présentent des ratios d'activités similaires. Toutefois, la surexpression de la NDST1 ou de la NDST2 dans la lignée cellulaire HEK293 conduit à la production de chaînes HS aux profils de sulfatation différents. En effet, les cellules surexprimant la NDST2 produisent des HS avec un taux de *N*-sulfatation plus élevé et des domaines NS plus longs que ceux synthétisés par les cellules surexprimant la NDST1 (Cheung et al., 1996; Pikas et al., 2000). Sur la base de ces données, il a été suggéré que les NDSTs n'ont pas d'activité redondante et que l'expression relative de chaque NDST détermine le profil de sulfatation des HS.

Cette hypothèse a été confirmée par des expériences d'inactivation génique chez la souris. Alors que l'absence de la NDST1 entraîne une léthalité néonatale élevée (Ringvall et al., 2010), que l'on peut relier à une diminution importante du taux de sulfation des chaînes HS, les souris invalidées pour la NDST2 sont viables, fertiles et expriment des chaînes HS sulfatées. Cependant, l'absence de NDST2 s'accompagne d'un déficit en mastocytes présentant des granules défectueux, résultat d'une diminution de la sulfation des chaînes d'héparine (Ledin et al., 2004; Ringvall et al., 2010). Ces données suggèrent que la NDST1 est requise pour initier l'ajout de *N*-sulfates sur les chaînes HS alors que la NDST2 étendrait les zones NS de l'héparine et des HS hautement sulfatés. Le phénotype et la structure des HS provenant de souris déficientes en NDST3 a également été décrit, alors que les données manquent encore sur l'inactivation de la NDST4. Les souris NDST3^{-/-} ne présentent pas de problèmes de développement particuliers, et les HS ont un taux de sulfatation normal (Pallerla et al., 2008). Il semble que son absence puisse être compensée par la présence des autres NDSTs. Il a de plus été suggéré que la NDST3 n'était pas ou peu impliquée dans la *N*-sulfatation des HS, mais

seulement dans la *N*-déacétylation des résidus de GlcNAc. En effet, les cellules déficientes en NDST1 et NDST2 mais exprimant la NDST3 synthétisent des HS sans aucun groupement *N*-sulfate, mais présentant toujours le même taux de GlcNH₂ (Holmborn et al., 2004).

Alors que la NDST1 et la NDST2 sont exprimées par la majorité des cellules, la NDST3 et la NDST4 ont un profil de distribution bien plus réduit, restreint au stade embryonnaire et à quelques tissus adultes (Kusche-Gullberg et al., 1998; Yabe et al., 2005). La NDST3 est retrouvée en abondance dans le cerveau adulte et les tissus embryonnaires et sa présence a également été décrite à moindre mesure dans les reins, le foie, le pancréas, la rate, les testicules et le thymus (Pallerla et al., 2008). L'expression de la NDST4 est encore plus restreinte puisqu'on ne la retrouve qu'en faible quantité dans le cerveau adulte et les tissus embryonnaires (Aikawa et al., 2001).

Bien que peu d'études aient porté sur la régulation de l'expression des NDSTs, quelques travaux ont mis en évidence des variations d'expression lors de processus inflammatoires et dans des pathologies comme le diabète et le cancer. Il a ainsi été montré chez la Souris qu'une lésion vasculaire entraînait une forte augmentation de l'expression de la NDST1 dans les cellules environnantes (Adhikari et al., 2008). *In vitro*, des modifications d'expression des NDSTs ont également été mises en évidence en réponse à différents stimuli. Ainsi, la stimulation d'astrocytes par le TGF- β inhibe l'expression des NDST1, NDST2 et NDST3 alors que le TGF- α n'agit que sur l'expression de la NDST3 (Properzi et al., 2008). Il a également été montré dans des cellules endothéliales HMVEC que le TNF- α induisait une réduction de l'expression de la NDST3. Le LPS a également un effet sur l'expression des NDSTs, en augmentant celle de la NDST1 et réduisant celles des NDST2 et 3 dans les mêmes cellules (Krenn et al., 2008). Cependant, des résultats différents ont été obtenus avec une autre lignée de cellules endothéliales, les HMEC-1. Dans ce cas, la stimulation par le TNF- α ou l'IFN- γ (Interféron- γ) entraîne une augmentation du taux d'expression de la NDST1 et de la NDST2 (Carter et al., 2003). Certains types de cancers peuvent également avoir une influence sur l'expression des NDSTs. Par exemple, la surexpression du proto-oncogène Ras dans des cellules endothéliales entraîne une diminution de l'expression de la NDST1, ce qui conduit à une baisse générale du taux de sulfatation des HS produits (Lopes et al., 2006). Dans des cellules de mélanomes, il a aussi été montré que l'expression d'un facteur d'échange des protéines G nommé Epac1 était liée à l'expression de la NDST1. Lorsque l'activité de ce facteur est inhibée, l'expression de la NDST1 est diminuée, ce qui conduit à une diminution de la migration et de l'agressivité de ces cellules (Baljinnyam et al., 2011).

Il est donc difficile actuellement de définir un mécanisme de régulation générale de l'expression de ces enzymes, puisque les variations observées semblent dépendre de la nature des stimuli et du modèle utilisé. En outre, il ne semble pas exister de compensation transcriptionnelle entre les NDSTs, puisque l'invalidation d'expression d'une des isoenzymes n'entraîne pas de modification de l'expression des autres isoformes chez les souris déficientes (Ledin et al., 2006). Peu de choses sont également connues quant aux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des NDSTs. Seule une étude a montré que la forte expression de la NDST2 dans les mastocytes était liée à l'action du facteur de transcription GABP (*GA-Binding Protein*) (Morii et al., 2001).

Les ARNm des NDSTs possèdent des séquences 5'-UTR (*5' Untranslated Region*) longues (250 à 720 nucléotides), ce qui suggère un possible mécanisme de régulation traductionnelle. De plus, les régions 5'-UTR des NDST2, NDST3 et NDST4 contiennent des sites IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) décrits pour permettre une traduction indépendante de la coiffe et offrir un niveau supérieur de contrôle (Grobe et al., 2002a). Finalement, des études récentes ont montré que l'expression de la NDST1 peut être régulée par des microARN (miR-21 et miR-191) (Ibrahim et al., 2014).

3.2.4. La C5-épimérase

Après la réaction de *N*-déacétylation/*N*-sulfatation, la seconde modification des chaînes HS est une épimérisation de certains résidus d'acide D-glucuronique en acide L-iduronique. Cette réaction est catalysée par la glucuronyl C5-épimérase, enzyme spécifique des chaînes HS ayant pour particularité d'agir sur le polymère naissant, contrairement à la plupart des épimérases agissant seulement sur les monosaccharides (Valla et al., 2001).

Un seul gène de la C5-épimérase existe chez les vertébrés (J. P. Li et al., 2001), il code pour une protéine transmembranaire de type II comportant 617 acides aminés. Elle est composée d'un domaine Nt cytoplasmique de 11 acides aminés, puis d'un domaine transmembranaire, d'une région « tige » et enfin d'une région globulaire très conservée entre les espèces et possédant l'activité épimérase. Comme les autres enzymes impliquées dans la maturation des HS, elle est retrouvée dans l'appareil de Golgi (Crawford et al., 2001; Pinhal et al., 2001).

Le mécanisme d'action de la C5-épimérase consiste en une élimination/addition d'un proton en position C5 de l'acide hexuronique, accompagnée ou non d'une inversion de configuration. Cette réaction nécessite la formation d'un carbanion intermédiaire et a lieu sans aucune rupture de la liaison osidique (Valla et al., 2001). Alors que la réaction est réversible *in*

vitro, comme l'ont montré plusieurs études utilisant des substrats polysaccharidiques divers (polysaccharide K5 *N*-sulfaté et héparine *O*-désulfatée), il semble qu'elle soit irréversible *in vivo* (Hagner-McWhirter et al., 2004).

La C5-épipimérase agit principalement sur les GlcUA situées à l'extrémité réductrice de résidus de GlcNS. Par conséquent, les domaines NA des HS ne possèdent pas de résidu IdoUA alors que les domaines NS et NA/NS en contiennent de fortes quantités (Hagner-Mcwhirter et al., 2000). A l'inverse, il a été clairement établi qu'un niveau élevé d'*O*-sulfatation inhibe la réaction d'épipimérisation, ce qui implique que cette enzyme agit après les NDST mais avant les *O*-sulfotransférases.

Les souris déficientes en Hsepi présentent de nombreux problèmes de développement et ne sont pas viables après leur naissance. Les HS produits par ces souris sont complètement dépourvus de résidu IdoUA et présentent des défauts de *O*-sulfatation (Ledin et al., 2004; Li et al., 2003). De plus, les mastocytes humains dépourvus de C5-épipimérase produisent de l'héparine sans résidus IdoUA. Ces études soulignent l'importance de cette modification dans la maturation des HS (Feyerabend et al., 2006). En outre, il semblerait que l'activité de la C5-épipimérase soit dépendante de son interaction avec la 2-OST. Plusieurs travaux ont en effet montré que la co-expression de la 2-OST et de la C5-épipimérase était requise pour leurs activités mutuelles.

La C5-épipimérase est exprimée dans la totalité des tissus, que ce soit au stade embryonnaire ou à l'âge adulte (J. P. Li et al., 2001). Cependant son expression peut être modulée en réponse à des modifications physiopathologiques, comme dans le cancer ou l'inflammation. Il a ainsi été montré dans une étude utilisant 74 patientes atteintes d'un cancer du sein que dans 83% des cas, l'expression de la C5-épipimérase était diminuée voire éteinte (Grigorieva et al., 2007). De même, son expression est largement diminuée dans des cellules endothéliales qui surexpriment l'oncogène Ras (Lopes et al., 2006). La réexpression de la C5-épipimérase dans des cellules de cancer du sein ou de poumons inhibe leur prolifération *in vitro* ainsi que la croissance tumorale *in vivo*. Les mécanismes mis en jeu sont toutefois différents puisque l'effet antiprolifératif a été relié à l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et pro-apoptotiques dans les cellules de cancer du sein (Prudnikova et al., 2010), alors qu'il est dû à la diminution de plusieurs facteurs pro-angiogéniques dans le cancer du poumon à petites cellules (Grigorieva et al., 2011). Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus dans d'autres études. Ainsi, chez certains patients atteints d'un cancer de la prostate, l'expression de la C5-épipimérase est augmentée, et cette surexpression est reliée à l'agressivité de la tumeur (Prudnikova et al., 2013).

Une seule étude a porté sur la régulation d'expression de la C5-épimérase. Les auteurs ont montré que le complexe β -caténine/TCF (T-Cell Factor)-4 est impliqué dans l'activation transcriptionnelle du promoteur de la C5-épimérase (Ghiselli et al., 2005). Il est intéressant de noter que ce complexe β -caténine/TCF-4 (*Transcription Factor-4*) intervient dans la voie Wnt, qui est elle-même dépendante des HS (Polakis, 2000). Finalement, une étude récente a mis en évidence une régulation négative de l'expression de la C5-épimérase par le microARN-218 (Prudnikova et al., 2012).

3.2.5. La 2-O-sulfotransférase

La famille des uronosyl 2-O-sulfotransférases catalysent le transfert d'un groupement sulfate sur la fonction hydroxyle en position C2 des acides hexuroniques. Une seule enzyme est impliquée dans cette réaction sur les chaînes HS.

Le gène *HS2ST1* code pour la 2-OST des chaînes HS et produit une protéine de 356 acides aminés, qui comme les autres enzymes de maturation des HS, est transmembranaire (type II) et réside dans l'appareil de Golgi (Kobayashi et al., 1997; Pinhal et al., 2001). Une étude de modélisation moléculaire a mis en évidence six résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation du PAPS (K83, T84, S86, T87, R164 et S172), cinq impliqués dans la fixation du substrat (R80, R178, D181, R189 et R288) et deux résidus d'histidine (H140 et H142) indispensables à l'activité catalytique de l'enzyme (Xu et al., 2007). Les résidus d'acides aminés responsables de la spécificité de substrat ont également été caractérisés. Alors que le mutant R189A transfère uniquement des groupements sulfates sur les résidus de GlcUA, les mutants Y94A et H106A transfèrent préférentiellement les groupements sulfates sur les résidus IdoUA (Bethea et al., 2008). Ces données ont été confirmées par une étude plus récente basée sur la cristallisation de la 2-OST en complexe avec un heptasaccharide. Les auteurs ont ainsi pu confirmer l'implication de la plupart de ces acides aminés dans l'activité de l'enzyme (Liu et al., 2014).

Des expériences de cristallographie ont montré que la 2-OST existe sous forme d'homotrimère. L'interaction entre les monomères s'effectue *via* le domaine transmembranaire. De plus, la 2-O-sulfotransférase forme un complexe avec la C5-épimérase nécessaire à leurs activités respectives *in vivo*. Cependant, il est improbable que la C5-épimérase puisse constituer un des monomères du trimère formé par la 2-OST. D'ailleurs, la 2-OST purifiée à partir de cellules CHO est sous forme trimérique mais ne contient pas de C5-épimérase. Le complexe formé *in vivo* pourrait donc faire intervenir la forme trimérique de la 2-OST et la C5-épimérase dans un complexe supramoléculaire (Bethea et al., 2008).

Bien que les résidus d'IdoUA soit ses substrats préférentiels, la 2-OST peut également agir sur les résidus de GlcUA. L'analyse des HS produits par des cellules CHO déficientes en 2-OST (pgsF-17) a montré que non seulement il n'y avait plus de motifs HS contenant des résidus IdoUA2S, mais que les motifs contenant les résidus de GlcUA2S avaient également disparus (Bai et al., 1996). C'est donc la même enzyme qui transfère un groupement sulfate en position C2 des résidus de GlcUA et IdoUA. Cela a été confirmé par l'étude de la lignée cellulaire HEK293 surexprimant la 2-OST. Les HS produits contiennent de fortes quantités de résidus GlcUA2S, alors que le taux de résidus IdoUA2S est diminué par rapport aux cellules contrôles indiquant que la 2OST agit sur les deux types d'acides uroniques (Rong et al., 2001, 2000).

Les résidus IdoUA2S sont le plus généralement situés dans les zones NS et NA/NS des HS et sont très abondants dans l'héparine. En revanche, les résidus GlcUA2S restent rares et peu de choses sont connues sur leur distribution et leur rôle fonctionnel. Cette répartition peut facilement s'expliquer par la spécificité de substrat de la 2-OST qui, comme la C5-épimérase agit préférentiellement sur les résidus d'acides uronique situés en position réductrice des GlcNS, mais avant les autres *O*-sulfotransférases (Merry et al., 1999). En effet, il a été démontré que la 6-*O*-sulfatation inhibe l'action de la 2-OST (Kobayashi et al., 1996; Rong et al., 2001, 2000). En fonction du type cellulaire, le taux de 2-*O*-sulfatation des résidus d'IdoUA oscille entre 50 et 90 %, ce qui suggère que d'autres régulateurs agissent sur la 2-*O*-sulfatation (Safaiyan et al., 2000).

La 2-*O*-sulfatation des HS est une modification importante comme en témoigne l'étude de souris déficientes en 2-OST. Ces dernières décèdent à la naissance principalement à cause de malformations rénales. Elles présentent des HS totalement dépourvus de résidus 2-*O*-sulfatés et il a été suggéré que cela influait sur l'interaction entre les HS et des ligands extracellulaires tels que des chimiokines ou des facteurs de croissance (V. A. Wilson et al., 2002).

Alors que la 2-OST est exprimée de manière ubiquitaire chez l'adulte, son expression est beaucoup plus variable chez l'embryon et est dépendante du tissu et du stade de développement (Rong et al., 2001). Il a également été montré *in vitro* et *in vivo* que la réponse inflammatoire entraîne une forte augmentation de l'expression de la 2-OST, corrélée à une augmentation de résidus 2-*O*-sulfatés (Adhikari et al., 2008; Properzi et al., 2008). De même, l'expression de la 2-OST est augmentée chez les patients atteints de myélomes multiples. Toutefois, la forte expression de cette enzyme est corrélée à un bon pronostic de survie dans ce type de cancer (Bret et al., 2009). En revanche, une étude réalisée *in vitro* a montré que des cellules surexprimant l'oncogène Ras avaient une expression de la 2-OST augmentée par

rapport aux cellules contrôles, et que cette enzyme participait à l'agressivité des cellules cancéreuses (Lopes et al., 2006). De même, l'expression de la 2-OST a été corrélée à la prolifération et l'invasion de cellules issues de cancer de la prostate. Cette étude a aussi montré que les facteurs de transcription HIF1 α et ATF2 se lient au promoteur de la 2-OST et augmentent son expression (Ferguson et al., 2011).

3.2.6. Les 6-O-sulfotransférases

Les glucosaminyl 6-O-sulfotransférases sont une famille d'enzymes responsables de la sulfatation en position C6 des résidus de GlcN. Pour les HS, trois isoenzymes ont été identifiées, purifiées, clonées et caractérisées chez les Vertébrés, codées par trois gènes différents (Habuchi et al., 2000). Chez la Souris et chez l'Homme, une quatrième isoforme produite par épissage alternatif du gène codant pour la 6-OST2 a été identifiée. Cet épissage conduit à la production d'une enzyme plus courte de 40 acides aminés situés dans la région « tige » nommée 6-OST-2S (Habuchi et al., 2003).

Comme les autres enzymes de maturation des HS, les 6-OSTs sont des protéines transmembranaires de type II (Habuchi et al., 2000). Elles sont localisées dans l'appareil de Golgi, et plus particulièrement dans le compartiment *trans* comme le montre une étude utilisant des 6-OSTs couplées à la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Cette approche a également permis de démontrer l'importance de la région « tige » dans la localisation de ces enzymes et dans le maintien de leur conformation active (Opat et al., 2000).

Les groupements 6-O-sulfates sont retrouvés tout au long des chaînes HS, que ce soit au niveau des zones NS, NA/NS et même NA. Cependant, la majorité est localisée dans les zones NS à proximité des résidus IdoUA2S (Maccarana et al., 1996). Cette répartition peut s'expliquer par la large spécificité de substrat de cette famille d'enzyme. Il a en effet été démontré *in vitro* que les 6-OSTs sont capables d'agir sur un grand nombre de structures HS. Ainsi, elles catalysent la 6-O-sulfatation des GlcNAc et GlcNS localisées du côté réducteur de résidus GlcUA \pm 2S ou IdoUA \pm 2S (Smeds et al., 2003; Zhang et al., 2001a). Cependant, elles possèdent quelques différences de spécificité. La 6-OST1 (411 AA) agit préférentiellement sur les unités disaccharidiques IdoUA-GlcNS alors que l'activité de la 6-OST2 (645 AA (forme longue)) dépend de la concentration en substrat : elle pourra ainsi sulfater les unités GlcUA-GlcNS si elles sont présentes en grande quantité (O. Habuchi, 2000). Quant à la 6-OST3, elle peut agir sur les deux types d'unités indépendamment de leurs concentrations, mais elle est plus active sur des motifs 2-O-sulfatés (Jemth et al., 2003).

L'étude de souris déficientes en 6-OSTs a permis de mettre en évidence l'importance de cette modification des HS (Habuchi et al., 2007; Izvolsky et al., 2008). Les souris invalidées pour la 6-OST1 décèdent majoritairement au stade embryonnaire en raison d'un défaut de vascularisation placentaire. Celles qui arrivent à terme ne présentent pas d'anomalies de développement majeures, mais elles ont un retard de croissance qui conduit à une perte de poids importante et le plus souvent à leur décès rapide. Les HS isolées de souris invalidées pour le gène *Hs6st1* présentent une réduction marquée des résidus GlcNS6S et GlcNAc6S, ce qui indique un rôle prépondérant de la 6-OST1 dans cette étape de maturation (Habuchi et al., 2007). Par contre, les souris *Hs6st2*^{-/-} ne présentent pas de phénotype anormal apparent, se développent normalement et sont fertiles, ce qui souligne une absence de redondance fonctionnelle (Sugaya et al., 2008). Ainsi, les souris double déficientes en 6-OST1 et en 6-OST2 présentent de gros défauts de développement et décèdent à un stade embryonnaire encore plus précoce que les souris *Hs6st1*^{-/-} (Habuchi et al., 2010), ce qui suggère des activités complémentaires. Les héparanes 6-*O*-sulfatés sont nécessaires à l'interaction avec de nombreux facteurs de croissance et morphogènes. Par conséquent, la signalisation de ces molécules est largement diminuée en l'absence de résidus 6-*O*-sulfatés (Ferrerias et al., 2012). Le développement est donc fortement impacté, ce qui peut expliquer les phénotypes observés chez les souris déficientes en 6-OSTs.

L'expression des 6-OSTs est dépendante du stade de développement et du type cellulaire. Chez l'adulte, la 6-OST1 est principalement exprimée dans le foie alors que la 6-OST2 est plus abondante dans le cerveau. La 6-OST3, quant à elle, est faiblement exprimée mais de manière ubiquitaire. La forme courte 6-OST2S est préférentiellement exprimée dans les ovaires, le placenta et les reins fœtaux (Habuchi et al., 2003, 2000). Le profil d'expression des 6-OSTs est largement modifié au cours du développement embryonnaire (Cadwallader et al., 2006a; Sedita et al., 2004). Chez la souris, le transcrit codant pour la 6-OST1 est principalement exprimé dans les tissus neuraux et épithéliaux, alors que la 6-OST2 est largement présente dans les tissus mésenchymateux. En revanche, le transcrit codant pour la 6-OST3 apparaît plus tard au cours du développement (Sedita et al., 2004). Ces différences d'expression spatiale et temporelle confortent l'hypothèse de l'absence de redondance fonctionnelle entre les 6-OSTs.

Les 6-OSTs sont résidentes de l'appareil de Golgi. Cependant, elles peuvent également être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles ont en effet été purifiées à partir de surnageant de culture de cellules CHO (Habuchi et al., 1995). Une étude plus récente a démontré que la sécrétion de la 6-OST3 est dépendante de la protéase BACE (*B Amyloid Cleaving Enzyme*),

également impliquée dans la sécrétion d'autres enzymes golgiennes. L'inhibition de cette protéase conduit à l'accumulation de la 6-OST3 dans l'appareil de Golgi, ce qui entraîne une forte augmentation de l'activité 6-*O*-sulfotransférase. Ces études suggèrent que les cellules peuvent réguler le taux de 6-*O*-sulfatation des HS en modulant la concentration intracellulaire des 6-OSTs (Do et al., 2006; Nagai et al., 2007).

3.2.7. Les 3-*O*-sulfotransférases

Dans le schéma général de biosynthèse des HS, la dernière étape de maturation des HS est assurée par la famille des glucosaminyl 3-*O*-sulfotransférases qui catalysent le transfert d'un groupement sulfate sur la fonction hydroxyle en position C3 des glucosamines. Cette modification est rare et mais primordiale pour la formation de motifs de fixation spécifiques comme ceux reconnus par l'antithrombine III (AT-III) ou de la glycoprotéine gD du virus HSV-1 (*Herpes Simplex Virus 1*) (Kusche-Gullberg et al., 2003).

Chez les Mammifères, sept isoenzymes (3-OST1, 2, 3A, 3B, 4, 5 et 6) ont été purifiées, clonées et caractérisées (Lawrence et al., 2007). Toutes les 3-OSTs sont codées par des gènes distincts et présentent une organisation génomique similaire. Elles sont très conservées puisqu'elles possèdent au moins 60% d'homologie au niveau de leur domaine sulfotransférase (Thacker et al., 2014). Deux groupes peuvent cependant être distingués sur la base de leur homologie de séquence, le premier contenant les 3-OST1 (307 AA) et 5 (346 AA) et le second les 3-OST2 (367 AA), 3A (406 AA), 3B (390 AA), 4 (456 AA) et 6 (342 AA) (Cadwallader et al., 2006b). Les 3-OSTs présentent également de fortes homologies de séquence avec les domaines sulfotransférases des NDSTs ; en revanche, aucune homologie n'est retrouvée avec les 6-OSTs, à l'exception des séquences impliquées dans la fixation du PAPS (Aikawa et al., 2001; O. Habuchi, 2000; Shworak et al., 1999).

De manière intéressante, les deux groupes peuvent également être identifiés en fonction de leur spécificité de substrat. Ainsi, les 3-OST1 et 5 sont capables de générer le motif reconnu par l'AT-III, alors que les autres assurent la synthèse de motifs reconnus par la protéine gD de HSV-1 (Lawrence et al., 2007). En effet, la 3-OST1 agit préférentiellement sur les motifs contenant un résidu GlcUA dépourvu de groupement 2-*O*-sulfate et localisé du côté non-réducteur d'un résidu de GlcNS (Mochizuki et al., 2008; Shworak et al., 1997; Zhang et al., 1999). L'enzyme peut tolérer la présence d'un IdoUA à la place du résidu GlcUA mais la 2-*O*-sulfatation est incompatible avec son activité (Nguyen et al., 2012; Zhang et al., 2001b). En revanche, les 3-OST2, 3A, 3B, 4 et 6 préfèrent les sites contenant un résidu IdoUA2S en position -1 du résidu de glucosamine, qui peut être sous forme GlcNS ou GlcNH₂ (Lawrence et

al., 2007; Meissen et al., 2009; Mochizuki et al., 2008). Quant à la 3-OST5, elle peut agir sur les deux types de motifs, ce qui explique sa capacité à produire les motifs AT-III et gD (Chen et al., 2005; Duncan et al., 2004). Il a d'ailleurs été démontré que les 3-OSTs, à l'exception de la 3-OST1, sont capables de catalyser *in vitro* la formation du disaccharide tétrasulfaté IdoUA2S-GlcNS3S6S. Toutefois, cette modification est très rare dans les chaînes HS et ne représenterait que 0,15 à 1% des disaccharides *in vivo* (Mochizuki et al., 2008).

Les 3-OSTs sont des protéines transmembranaires de type II, à l'exception de la 3-OST1 qui ne possède pas de domaine transmembranaire et est donc une protéine intraluminale golgienne (Shworak et al., 1999). A l'instar des autres sulfotransférases, les 3-OSTs forment des complexes multimériques. La 3-OST3A, par exemple, se fixe sous forme monomérique sur les HS et les CS avec une affinité équivalente ; en revanche, seuls les HS sont capables d'induire son oligomérisation, ce qui est nécessaire à son activité. En outre, il a été démontré que la fixation sur les chaînes HS induit un changement conformationnel de la 3-OST1, ce qui serait à l'origine de la formation de structures multimériques (Edavettal et al., 2004a; Wille et al., 2007).

La structure tridimensionnelle de plusieurs 3-OSTs (1, 3A et 5) a été élucidée (Edavettal et al., 2004b; Moon et al., 2004; Xu et al., 2008). Ainsi, le domaine catalytique de la 3-OST3A possède une conformation sphérique avec un large sillon ouvert capable d'accueillir l'oligosaccharide. Le centre de l'enzyme est formé par un feuillet β parallèle entouré d'hélices α . Les sites 5'PSB et 3'PB de fixation du PAPS sont retrouvés au cœur de cette structure (Moon et al., 2004). Les autres 3-OSTs possèdent une structure similaire à celle de la 3-OST3A, avec toutefois de légères différences au niveau des boucles externes. Par mutagenèse dirigée de la 3-OST1, il a été montré que plusieurs résidus d'acides aminés sont indispensables à l'activité catalytique de l'enzyme ainsi qu'à la fixation du substrat. Ainsi, les acides aminés basiques R72, R67, K123 et R276 servent à la fixation du substrat. En leur absence, la 3-OST1 est capable de fixer le PAPS *via* les motifs 5'PSB et 3'PB mais ne peut plus fixer le substrat. De plus, il a été montré que le résidu E90, conservé dans toutes les 3-OSTs, participe au mécanisme catalytique. En effet, sa mutation n'affecte ni la fixation du PAPS, ni celle du substrat, mais conduit à une inhibition quasi-totale de l'activité enzymatique (Edavettal et al., 2004b; Muñoz et al., 2006).

Les fonctions associées à la 3-O-sulfatation des HS ont été essentiellement étudiées dans le cadre des interactions avec trois ligands particuliers : l'AT-III, la glycoprotéine gD du HSV-1 et la cyclophiline B (Deligny et al., 2010; Petitou et al., 2003; Shukla et al., 1999; Vanpouille et al., 2007). Toutefois, les études sont rendues difficiles par la faible prévalence de motifs 3-

O-sulfatés dans les HS (moins de 10 % chez les Vertébrés) et les difficultés à caractériser des modifications. Les souris déficientes en 3-OST1 sont viables et ne présentent pas de phénotypes particuliers. Bien qu'une réduction marquée de la fixation de l'AT-III sur les HS est observée, ces souris ne présentent pas de problème de coagulation. Cette observation suggère que d'autres GAGs peuvent compenser la perte de l'activité anticoagulante des HS (HajMohammadi et al., 2003; Shworak et al., 2002; Weitz, 2003). Il a par exemple été montré que les chaînes CS de la thrombomoduline sont également capables de favoriser l'activité inhibitrice de l'AT-III vis-à-vis de la thrombine (Koyama et al., 1991).

L'expression des gènes codant pour les différentes isoformes des 3-OSTs est régulée très finement de façon spatio-temporelle. Alors que les 3-OST1, 3A et 3B et 6 sont exprimés dans la plupart des tissus, les 3-OST2 et 4 sont plutôt restreintes au cerveau (Lawrence et al., 2007; Mochizuki et al., 2008; Shworak et al., 1999). La 3-OST5 est, quant à elle majoritairement exprimée dans les muscles squelettiques et le cerveau (Xia et al., 2002). Toutes les lignées cellulaires expriment au moins une 3-OST, à l'exception de la lignée CHO et des cellules murines issues de tumeurs Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), qui synthétisent des HS complètement dénués de groupements 3-*O*-sulfates (Zhang et al., 2001b). On peut également noter que la majorité des tissus étudiés expriment au moins une isoforme de type AT-III et une isoforme de type gD (Cadwallader et al., 2006b; Deligny et al., 2010; Girardin et al., 2005; Vanpouille et al., 2007).

De manière générale, l'expression de la 3-OST2 est réprimée dans les lignées cancéreuses et de nombreuses tumeurs cancéreuses humaines (Bret et al., 2009; Tsutsumi et al., 2003). Cette diminution est due à une hyperméthylation d'îlots CpG localisés dans la région 5' du gène et pourrait être impliquée dans la transformation maligne des cellules (Miyamoto et al., 2003) Ainsi, il a été suggéré que la méthylation du gène *Hs3st2* pourrait servir de marqueur précoce pour les cancers de la prostate et du col de l'utérus (Mahapatra et al., 2012; Shivapurkar et al., 2007). Une autre étude a montré que ce mécanisme de méthylation était plus large, puisque les gènes codant pour les 3-OST1, 2, 3A et 6 sont tous hyperméthylés dans des cellules de chondrosarcome (Bui et al., 2010). L'inhibition de cette réaction de méthylation restaure l'expression des 3-OSTs et entraîne une diminution de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses, associée à une augmentation de leur adhérence. Plus récemment, des fonctions contradictoires ont été attribuées à la 3-*O*-sulfatation des HS. En effet, il a été démontré que la surexpression de la 3-OST2 dans une lignée de cancer du sein augmente leur survie et leur prolifération (Vijaya Kumar et al., 2014). De même, des études portant sur les fonctions des protéines associées au télomère ont révélé que TRF2 (*Telomeric Repeat-binding*

Factor 2) induit l'expression de la 3-OST4, ce qui a pour effet d'induire une immuno-résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis des cellules NK (*Natural Killer*) (Biroccio et al., 2013). L'explication de ces effets contradictoires nécessite de comprendre les fonctions associées aux héparanes 3-*O*-sulfatées, ce qui devrait permettre d'identifier les cibles qui pourraient être influencées par la 3-*O*-sulfatation dans les cellules cancéreuses.

L'expression de certaines 3-OSTs peut également être modulée par des stimuli inflammatoires. Ainsi, le LPS diminue l'expression de l'ensemble des isoformes des 3-OSTs dans des cellules endothéliales HMVEC, alors que le TNF- α réduit l'expression des 3-OST1 et 4, mais augmente l'expression de la 3-OST3B dans les mêmes cellules (Krenn et al., 2008).

3.2.8. Les 6-*O*-endosulfatases

Après leur biosynthèse, les chaînes HS peuvent subir une dernière modification *via* l'intervention de deux 6-*O*-endosulfatases extracellulaires. Ces enzymes, dénommées Sulf-1 et Sulf-2 (*Sulfatase-2*), catalysent l'élimination de groupements 6-*O*-sulfates des résidus de GlcN localisés à l'intérieur des chaînes glycaniques (Lai et al., 2008; Vivès et al., 2014).

Sulf-1 et Sulf-2 ont été clonées et caractérisées récemment : elles appartiennent à la famille des aryl-sulfatases, dont 17 membres ont été identifiés à ce jour (Morimoto-Tomita et al., 2002). Elles possèdent 64% d'homologie de séquence et contiennent entre 6 et 12 sites de *N*-glycosylation, mais la fonction de ces chaînes glycaniques n'a pas été étudiée chez l'Homme. En revanche, il a été montré que la *N*-glycosylation est nécessaire à l'activité et la localisation de l'orthologue de Sulf-1 chez la Caille (Tang et al., 2009). Sulf-1 (871 AA) et Sulf-2 (870 AA) partagent une organisation structurale similaire avec une séquence signal en Nt, un domaine sulfatase de 372 acides aminés (CAT) comprenant un résidu de cystéine transformé en *N*-formylglycine indispensable à l'activité catalytique, un domaine hydrophile (HD) d'environ 300 acides aminés, et un dernier domaine Ct (G6S) d'environ 100 acides aminés qui présente une forte homologie avec le domaine Ct de la glucosamine-6-sulfatase lysosomale (Morimoto-Tomita et al., 2002). Alors que leur domaine CAT présente de fortes homologies avec les domaines catalytiques retrouvés dans les autres sulfatases, le domaine HD est quant à lui spécifique des Sulfs puisqu'aucune homologie de séquence avec d'autres protéines n'a pu être mise en évidence. Bien que ce domaine ne participe pas directement à l'activité enzymatique, il est indispensable à la reconnaissance des chaînes HS et à la localisation membranaire des Sulf (Tang et al., 2009). La fonction précise du domaine G6S n'est pas bien définie mais il a été suggéré qu'il pourrait être à l'origine de la reconnaissance spécifique des résidus de GlcN. Enfin, des sites de clivage protéolytique ont été identifiés dans les séquences des deux enzymes

et seraient indispensables à leur activité. En effet, les formes matures des Sulfs sont des hétérodimères formés de deux sous-unités de 75 et 50 kDa reliées par des ponts disulfures, résultant du clivage par la furine (ou protéases apparentées) des formes précurseurs de 125 kDa (Nagamine et al., 2010). Le domaine catalytique est localisé dans la sous-unité de 75 kDa, mais la présence de la seconde sous-unité est indispensable au bon fonctionnement de ces sulfatases. Cependant, le rôle exact de ces clivages protéolytiques reste incertain puisque des études contradictoires ont été publiées sur le sujet. Alors que des travaux montrent que la mutation des sites de clivage conduit à l'incapacité des Sulfs à moduler la signalisation de Wnt (Tang et al., 2009), d'autres ont montré que la mutation de ces sites n'avait aucun effet sur l'activité de ces enzymes (Nagamine et al., 2010).

In vitro, les deux Sulfs agissent préférentiellement sur des séquences contenant des répétitions du disaccharide trisulfaté UA2S-GlcNS6S, localisé dans les zones NS des chaînes HS et de manière plus restreinte sur le disaccharide disulfaté UA-GlcNS6S. Leur activité est drastiquement réduite en présence des autres types de disaccharides, soulignant l'importance de la *N*-sulfatation dans le processus (Seffouh et al., 2013; Vivès et al., 2014). Il ne faut cependant pas exclure la possibilité qu'elles puissent agir sur d'autres disaccharides *in vivo*, comme le suggèrent différentes études (Lamanna et al., 2006; Nagamine et al., 2012).

Comme les Sulfs ont une activité restreinte à certains disaccharides, elles ne réduisent le taux de sulfatation globale des HS que de 4 à 5%. Cependant, cette légère modification entraîne une profonde altération des propriétés d'interaction des HS avec leurs nombreux ligands, d'où l'implication des Sulfs dans de nombreux processus physiopathologiques (Uchimura et al., 2006). En effet, en modulant les interactions des HS avec les facteurs de croissance et les morphogènes, les Sulfs agissent sur la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhérence cellulaire.

Le rôle des Sulfs dans la modulation des réponses induites par les FGFs, les facteurs Wnt ou les BMPs (Bone Marrow Proteins) a été et est encore largement étudié. Dans le cas des FGFs, l'action des Sulfs est inhibitrice. En effet, la présence de chaînes HS sulfatées en position C2 de l'acide uronique et en positions C6 et N de la GlcN est requise pour former un complexe de signalisation stable entre les FGFs et leur récepteurs. L'élimination des groupements 6-*O*-sulfates conduit à la déstabilisation de ce complexe, d'où une inhibition de la signalisation en aval (Wang et al., 2004). A l'inverse, l'action des Sulfs est activatrice pour les facteurs Wnt puisque dans ce cas, la désulfatation des HS permet leur libération des chaînes HS et leur interaction avec leur récepteur Frizzled (Ai et al., 2003). De même, l'élimination des 6-*O*-sulfates est activatrice pour les BMPs par libération des complexes Noggin/BMP des chaînes

HS, ce qui permet aux BMPs d'interagir avec leurs récepteurs spécifiques et d'induire l'activation de voies de signalisation associées (Viviano et al., 2004).

Les Sulfs sont exprimées dans de nombreux tissus. Toutefois, les deux enzymes ne présentent pas la même distribution, suggérant des activités différentes en fonction du type cellulaire. De même, l'expression de chaque Sulf apparaît étroitement régulée de manière spatio-temporelle au cours du développement (Lum et al., 2007; Morimoto-Tomita et al., 2002). Le rôle des Sulfs a donc été largement étudié dans le contexte de l'embryogenèse. Des souris déficientes pour les deux sulfatases ont une taille réduite à la naissance et une très faible espérance de vie, liées à de nombreux défauts de développement. En revanche et de manière surprenante, l'inactivation d'une seule des deux Sulfs n'entraîne pas de défauts majeurs chez les souris déficientes, si ce n'est une mortalité légèrement augmentée dans les premiers mois de vie des souris Sulf-1^{-/-}, et quelques malformations ainsi qu'une réduction mineure du poids des souris Sulf-2^{-/-}. Cela est probablement dû au fait que l'inactivation de l'une des sulfatases peut être compensée par l'expression de la seconde (Lamanna et al., 2006). Les facteurs de croissance et les morphogènes sont également largement impliqués dans les processus d'homéostasie et de réparation tissulaire chez l'adulte. De ce fait, les endosulfatases sont capables de réguler ces événements. Il a par exemple été montré qu'elles participent à l'homéostasie des cartilages en modulant positivement l'activité des BMPs et négativement celle du FGFs (Vivès et al., 2014).

De nombreuses études se sont également intéressées aux rôles des Sulfs dans les cancers. Toutefois, les mécanismes d'action et les voies qu'elles régulent ne sont pas encore clairement élucidés. De plus, les données actuelles sont souvent contradictoires et difficilement interprétables, ce qui suggère qu'en fonction du type de cancer, l'action des Sulfs pourrait être différente. Ainsi, l'expression de Sulf-1 est augmentée dans certains cancers (ovaires, leucémie, gastrique, pancréas, cerveau, sein, poumons), alors qu'elle est fortement réduite dans d'autres (foie, sein, sarcome, rein, vessie). Quant à Sulf-2, son expression est dans la plupart des cas fortement augmentée. Selon les auteurs, des activités pro- ou anti-tumorales ont été associées à chacune des deux Sulfs en fonction du modèle étudié (Hammond et al., 2014; Vivès et al., 2014). Il reste donc de nombreuses interrogations sur le rôle exact de ces enzymes en conditions normales et pathologiques.

3.3. Elongation et maturation des CS/DS

3.3.1. Mécanisme général

Après la formation de l'amorce tétrasaccharidique, l'ajout d'un résidu de GalNAc est la première étape spécifique de la biosynthèse des chaînes CS/DS. Ce transfert est réalisé par la GalNAcT-I, différente de celle impliquée dans la polymérisation des chaînes glycaniques (Mikami et al., 2013b). Comme mentionné dans la partie HS, les mécanismes précis par lesquels le choix du type de GAGs est réalisé ne sont pas encore bien connus. Cependant, plusieurs observations suggèrent que différents processus de régulation pourraient participer à ce phénomène. Par exemple, la sulfatation des résidus Gal est exclusivement retrouvée au sein des chaînes de CS/DS, ce qui pourrait servir de signal pour leur biosynthèse (Sugahara et al., 2000). Il reste toutefois de nombreuses interrogations quant à la régulation des mécanismes moléculaires mis en jeu pour l'assemblage sélectif des chaînes HS ou CS/DS.

Après l'ajout de ce premier résidu, la polymérisation du squelette polysaccharidique est réalisée grâce à deux activités enzymatiques dénommées CS-GlcUAT-II et GalNAcT-II. Ces deux activités sont portées par un complexe enzymatique composé d'une combinaison variable de six membres de la famille des chondroïtanes synthétases (Izumikawa et al., 2008).

Dans le cas des DS, deux épimérasés dénommés DSE (*Dermatan Sulfate Epimerase*) et DSEL (*Dermatan Sulfate Epimerase Like*) convertissent les résidus de GlcUA en IdoUA après la formation du polymère précurseur. Ensuite, les chaînes CS et DS subissent des sulfatations sur différentes positions. Quatre 4-*O*-sulfotransférases (C4STs/D4ST) peuvent transférer un groupement sulfate en C4 des résidus de GalNAc (Evers et al., 2001; Hiraoka et al., 2000; Kang et al., 2002; Mikami et al., 2003; Yamauchi et al., 2000). Une 2-*O*-sulfotransférase spécifique des chaînes CS/DS, dénommée UST, peut transférer des groupements 2-*O*-sulfates en C2 de l'acide hexuronique (GlcUA ou IdoUA). Enfin, plusieurs 6-*O*-sulfotransférases ont été identifiées : trois C6STs peuvent ajouter un groupement sulfate en C6 des résidus de GalNAc, et une GalNAc-4-sulfate 6-*O*-sulfotransférase ajoute un groupement sulfate en C6 exclusivement sur des résidus GalNAc déjà 4-*O*-sulfatés. L'ordre d'action de ces sulfotransférases n'est pas aussi bien établi que pour les chaînes HS, en raison d'un manque de connaissances sur leurs spécificités de substrat (Pacheco et al., 2009b; Sugahara et al., 2003) (Figure 11).

3.3.2. Les CS/DS polymérasés

Six glycosyltransférases impliquées dans la formation du squelette polysaccharidique des CS/DS ont été purifiées, clonées et caractérisées. Elles sont nommées ChSy-1, ChSy-2, ChSy-3 (*chondroïtin synthase-1, -2, -3*), ChPF (*chondroïtin polymerizing factor*), ChGn-1 et ChGn-2 (*chondroïtin GalNAc transferase-1 et 2*) (Mikami et al., 2013b; Mizumoto et al., 2013a). Elles sont codées par six gènes différents présentant des similitudes au niveau de leur organisation génomique. De plus, leurs séquences sont proches puisqu'elles partagent au moins 40% d'homologie de séquence au niveau de leurs domaines catalytiques.

ChSy-1 est constitué de 802 acides aminés et sa séquence présente des homologies de séquence avec les β 3-galactosyltransférases et les β 4-galactosyltransférases au niveau des domaines N- et C-terminaux, respectivement. La ChSy-2 est formée, quant à elle, de 882 acides aminés et est très proche de la ChSy-1. ChPF présente 775 acides aminés et est très proche de la ChSy-3 qui possède 772 acides aminés. Enfin, les deux ChGn-1 et -2 présentent respectivement 532 et 542 acides aminés (Yada et al., 2003). Les structures tridimensionnelles de ces enzymes ne sont pas encore été élucidées. Seule une enzyme bactérienne, la K4CP (*Chondroïtin Polymerase K4*), impliquée dans la polymérisation du polysaccharide K4 analogue du précurseur des CS, a été cristallisée. Cette enzyme présente des homologies de séquences avec les polymérasés retrouvés chez les Vertébrés, suggérant que leurs structures tridimensionnelles sont également proches (Ninomiya et al., 2002; Osawa et al., 2009).

ChSy-1, ChSy-2 et ChSy-3 possèdent les deux activités GlcUAT-II et GalNAcT-II. Toutefois, elles sont incapables de polymériser les chaînes CS/DS seules. Par contre, en présence du ChPF, leurs activités enzymatiques sont largement augmentées et conduisent à la formation du polysaccharide précurseur. De ce fait, la polymérisation des chaînes de CS/DS peut être réalisée par un complexe enzymatique formé par de multiples combinaisons entre ChPF et ChSy-1, ChSy-2 ou ChSy-3. Bien que possédant une faible activité GalNAcT-II, ChPF aurait plutôt un rôle de protéine chaperonne assurant la bonne conformation des autres polymérasés et donc leur activité. Les deux dernières enzymes, ChGn-1 et ChGn-2, possèdent également les activités enzymatiques GalNAcT-I et GalNAcT-II. Elles peuvent donc participer à l'initiation et à l'élongation des chaînes CS/DS. Bien que les premières soient suffisantes pour assurer la formation du polysaccharide, il semble que la présence de ChGn-1 et ChGn-2 soit indispensable pour la régulation de la taille des chaînes ainsi que pour la formation du complexe de polymérisation (Izumikawa et al., 2008; Mikami et al., 2013b; Sato et al., 2003; Uyama et al., 2003).

Peu de données sont disponibles actuellement sur l'expression et la distribution des polymérasés impliqués dans la biosynthèse des CS/DS. Seules des études de Northern-Blot ou de RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*) ont été réalisées et ont permis de déterminer leur profil d'expression dans les tissus adultes (Izumikawa et al., 2008; Yada et al., 2003). ChSy-1 et ChPF ont des profils d'expression quasi-similaires. ChSy-1 est retrouvée principalement dans la rate, les reins, le foie, les poumons, les leucocytes mononucléés et en très forte quantité dans le placenta. ChPF est en plus très exprimé dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques. L'expression de ChSy-3 est beaucoup plus ubiquitaire, puisqu'on retrouve l'enzyme dans la totalité des tissus étudiés. De même, ChSy-2 a une expression ubiquitaire avec de très fortes quantités retrouvées dans le placenta. Pour les deux dernières enzymes, ChGn-1 et ChGn-2, aucune étude n'a été réalisée sur leurs profils de distribution.

3.3.3. Les C5-épimérasés

Deux épimérasés agissent sur les chaînes DS, nommées DSE et DSEL (Pacheco et al., 2009b). De manière surprenante, l'organisation génomique du gène codant pour la première est composée de cinq exons alors que le second gène n'est composé que d'un seul exon. Pourtant, les deux enzymes possèdent de fortes homologies de séquence. Du côté N-terminal, elles présentent toutes les deux un domaine épimérase présentant 51% d'homologie. DSE (958 AA) possède une région Ct qui se termine par deux domaines transmembranaires dont la fonction est encore inconnue. De même, DSEL (1221 AA) possède une région centrale incluant les deux domaines transmembranaires, mais sans homologie de séquence avec DSE (Malmström et al., 2012). Le domaine épimérase des deux enzymes porte quatre *N*-glycanes nécessaires à l'activité enzymatique (Pacheco et al., 2009a).

Sur la base de prédictions structurales, le domaine épimérase de la DSE peut être subdivisé en deux régions : une face Nt composée d'hélices α et une face Ct composée principalement de feuillets β . Ces deux régions Nt et Ct forment un sillon où le substrat peut être accueilli et modifié. En outre, ces régions possèdent des homologies de séquence avec nombreuses lyases agissant sur l'AH, les CS, les HS ou les alginates. Une étude par modélisation utilisant les données cristallographiques de l'héparinase II a permis de modéliser de le site catalytique de DSE et d'identifier des acides aminés conservés entre les deux protéines et potentiellement impliqués dans leur activité catalytique. Ces données ont permis de proposer un mécanisme catalytique où l'inversion stéréochimique du C5 de l'acide uronique est réalisée par la suppression d'un proton suivi de l'addition d'un nouveau proton du côté opposé du sucre.

Les étapes de ce mécanisme ont d'ailleurs été détaillées : le résidu His-450 enlève le proton en C5 du résidu d'acide glucuronique, puis la liaison glycosidique entre le résidu de GlcUA modifié et le résidu de GalNAc du côté non-réducteur est cassée par la Tyr-261, ce qui conduit à la formation d'une double liaison entre les C4 et C5 de l'acide hexuronique ; le composé intermédiaire est alors protoné du côté opposé par le résidu His-205 et la liaison glycosidique est reformée. Les deux premières réactions sont communes avec le mécanisme d'action des lyases, alors que les deux suivantes sont spécifiques des DS-épimérase. Ces dernières auraient donc évolué à partir des lyases bactériennes (Malmström et al., 2012).

La conversion des GlcUA en IdoUA est variable et peut conduire à un seul IdoUA par chaîne jusqu'à 100 % d'épimérisation. Les résidus IdoUA peuvent être regroupés en bloc, avec des régions contenant plus de 6 résidus consécutifs, ou au contraire être dispersés au milieu de résidus de GlcUA. Il a été montré que la formation de blocs IdoUA est dépendante de DSE mais également de la D4ST1, 4-*O*-sulfotransférase impliquée dans la maturation des chaînes DS (Maccarana et al., 2009; Pacheco et al., 2009b). Ces deux enzymes sont colocalisées dans l'appareil de Golgi. Ainsi, l'inhibition des deux épimérase ou de la D4ST1 conduit dans tous les cas à une diminution du taux de résidus IdoUA retrouvé au sein des chaînes DS. Par conséquent, il n'est pas étonnant que les blocs IdoUA soient retrouvés à proximité de résidus de GalNAc 4-*O*-sulfatés. Le taux de résidus IdoUA est également dépendant du type cellulaire et de la nature du protéoglycane. Par exemple, les fibroblastes issus de peau humaine produisent la décorine avec des chaînes DS contenant 60% de résidus IdoUA alors que les DS du versican n'en contiennent que 7% (Pacheco et al., 2009b).

Les deux épimérase sont exprimées de manière ubiquitaire dans l'organisme. La DSE est généralement la forme majeure, à l'exception du cerveau, où elle est faiblement exprimée alors que la DSEL y est largement représentée (Goossens et al., 2003; Nakao et al., 2000). Des souris invalidées pour DSE et/ou DSEL ont été produites et caractérisées. L'activité épimérase est majoritairement portée par la DSE *in vivo*, puisque son absence réduit de plus de 80% les résidus d'IdoUA. Bien que la DSEL soit majoritaire dans le cerveau, le taux de résidus IdoUA n'est diminué que de 38% chez les souris déficientes. Ces dernières ne présentent d'ailleurs pas de phénotypes particuliers, alors que la déficience en DSE entraîne de multiples anomalies, notamment au niveau de la formation des fibres de collagène et dans l'organisation des lames basales (Malmström et al., 2012).

Peu de données sont actuellement disponibles sur la régulation d'expression de ces enzymes. Seul un effet du TGF- β sur l'expression de l'une et/ou l'autre des épimérase a été reporté. En effet, ce facteur diminue de manière considérable le taux d'IdoUA retrouvés dans

les chaînes DS (Tiedemann et al., 2005). De même, il a été montré que l'expression de la DSE est réduite dans une lignée cellulaire cancéreuse œsophagienne, ce qui entraîne une réduction des taux de résidus d'IdoUA de plus de 80% (Thelin et al., 2012).

3.3.4. Les 4-*O*-sulfotransférases

Quatre 4-*O*-sulfotransférases ont été clonées et caractérisées, trois C4STs agissant principalement sur les chaînes CS et une D4ST pour les chaînes DS. Avec les C6STs, les C4STs sont les premières enzymes à agir sur le squelette polysaccharidique. La D4ST, quant à elle, agit de manière concomitante aux épimérasés et préférentiellement à proximité des résidus d'IdoUA (Mikami et al., 2013b).

Les gènes codant pour la C4ST1 et la C4ST3 partagent la même organisation avec trois exons, alors que ceux de la C4ST2 et de la D4ST1 ne présentent qu'un seul exon. Les C4STs et D4ST ne présentent pas de fortes homologues de séquences. La C4ST1 (352 AA) est homologue à 41% à la C4ST2 (414 AA), à 45% avec la C4ST3 (341 AA) et à 27% avec la D4ST1 (376 AA), notamment au niveau du domaine catalytique. La C4ST2 et la C4ST3 ne partagent, quant à elles, que 27% d'homologie. Enfin la D4ST1 présente 22% d'homologie avec la C4ST2 (Evers et al., 2001; Hiraoka et al., 2000). Ce sont, en revanche, toutes des protéines transmembranaires de type II qui présentent des motifs de fixation du PAPS conservés ainsi que trois autres régions conservées situées du côté Ct dont les fonctions ne sont pas encore élucidées. Elles sont constituées d'un domaine Nt cytoplasmique court, d'un domaine transmembranaire, d'une région « tige » et enfin d'un domaine Ct globulaire portant l'activité catalytique. Toutes appartiennent à la même famille dénommée HNK-1 (*human natural killer-1*), qui contient également d'autres sulfotransférases non impliquées dans la maturation des CS/DS (O Habuchi, 2000; Mikami et al., 2013b; Silbert et al., 2002; Sugahara et al., 2000). Toutefois, peu de données sont disponibles sur la conformation de ces sulfotransférases, et aucune structure n'a été élucidée à ce jour.

Les C4ST-1, C4ST-2 et C4ST-3 catalysent la sulfatation en C4 des GalNAc dans des chaînes dépourvues de résidus IdoUA, alors que la D4ST1 est responsable de la même réaction mais sur des GalNAc à proximité des résidus IdoUA. De ce fait, les C4STs et la D4ST1 sont respectivement impliquées dans la formation des disaccharides GlcUA-GalNAc4S et IdoUA-GalNAc4S (Mikami et al., 2013b).

A l'exception de la C4ST-3, les 4-*O*-sulfotransférases sont exprimées de manière ubiquitaire. Toutefois, la déficience en C4ST-1 conduit à une baisse considérable de la quantité de CS produits, ce qui indique d'une part, qu'aucune des autres 4-*O*-sulfotransférases ne peut

compenser son absence et d'autre part, qu'elle aurait un rôle plus général dans la synthèse des chaînes CS (Kluppel et al., 2005; Mizumoto et al., 2009; Uyama et al., 2006). Ainsi, il a été démontré que la 4-*O*-sulfatation des résidus à l'extrémité non-réductrice du polysaccharide favorise la polymérisation par le complexe ChSy-1/ChPF. La C4ST-1 pourrait réguler la taille des chaînes CS polymérisées (Izumikawa et al., 2011).

Il a également été suggéré que la C4ST-2 coopère avec la ChGn-1 pour réguler le nombre de chaînes CS. En effet, la ChGn-1 participe à l'initiation de la biosynthèse des CS, en transférant le premier résidu de GalNAC sur l'amorce tétrasaccharidique. Toutefois, il a été montré que le pentasaccharide formé n'est pas bon substrat pour les polymérases si le résidu de GalNac n'est pas 4-*O*-sulfaté. La C4ST2, en catalysant cette réaction, aurait donc un effet positif sur la polymérisation des polysaccharides (Izumikawa et al., 2012).

La C4ST-1 est très fortement exprimée dans la rate, le thymus, les leucocytes, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, les poumons et le placenta. La C4ST-2 est plus ubiquitaire mais de fortes quantités sont retrouvées dans le cœur, la moelle épinière, la thyroïde, l'hypophyse, la glande surrénale, ainsi que les reins fœtaux, la rate fœtal et les poumons fœtaux. La C4ST-3, quant à elle, est exprimée de manière beaucoup plus restreinte puisqu'on ne la retrouve pratiquement que dans le foie. Enfin, la D4ST1 est majoritairement exprimée dans le cœur, le placenta, le foie, et le pancréas (Evers et al., 2001; Hiraoka et al., 2000; Yamauchi et al., 2000). A ce jour, seules des souris déficientes en D4ST1 et C4ST1 ont été construites et caractérisées. Alors que les souris déficientes en C4ST1 ne présentent pas de phénotypes particuliers, les souris invalidées pour la D4ST1 présentent une fertilité réduite, une fragilité accrue de la peau et des anomalies du développement neuronal (Bian et al., 2011).

La stimulation des cellules par des facteurs tels que le TGF- β , l'EGF ou le PDGF induit une production accrue de CS. Cette augmentation serait due à une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse des CS, et plus particulièrement les C4ST-1 et C4ST-2 (Little et al., 2002). De même, l'expression de la C4ST-1 est augmentée dans plusieurs types de cancers (Bret et al., 2009; Potapenko et al., 2010). Ainsi, les CS 4-*O*-sulfatés ont été impliqués dans la progression de différents types de cancers (Basappa et al., 2009). Par exemple, ils participent à l'invasion des cellules cancéreuses de mélanome *via* la fixation et l'activation de métalloprotéinases (Iida et al., 2007). Toutefois, des données contradictoires ont été reportées, puisque l'expression de la C4ST-1 dans les cancers colorectaux diminue avec la progression de la tumeur (Kalathas et al., 2009). La D4ST1 serait également impliquée dans certains types de cancers. Par exemple, elle est surexprimée dans les cancers de l'œsophage, et son inhibition réduit la prolifération et la migration des cellules tumorales (Thelin et al., 2012).

3.3.5. Les 6-*O*-sulfotransférases

Trois 6-*O*-sulfotransférases catalysent le transfert d'un groupement sulfate en C6 des résidus de GalNAc sur les chaînes CS/DS. Les C6ST-1 et -2 ont une large spécificité de substrat alors que la troisième, appelée GalNAc4S-6ST, ne peut agir que sur les résidus de GalNAc préalablement 4-*O*-sulfatés (Mikami et al., 2013b).

Les trois 6-*O*-sulfotransférases ont été caractérisées, clonées et purifiées (Fukuta et al., 1998; Kitagawa et al., 2000; Mazany et al., 1998; Ohtake et al., 2001). Les séquences génomiques codant pour les C6ST-1 et C6ST-2 sont réparties sur seulement deux exons. Par contre, le gène codant pour la GalNAc4S-6ST (*CHST15*) contient plusieurs exons qui, après épissage alternatif, peuvent donner lieu à quatre isoformes de l'enzyme. De manière surprenante, la séquence codante de la GalNAc4S-6ST est identique à 99% à celles des produits des gènes RAG (*Recombination-Activating Gene*) exprimés dans les lymphocytes B. Toutefois, les séquences protéiques diffèrent, à cause d'une délétion conduisant à un changement du cadre de lecture.

Alors que les C6ST-1 (479 AA) et C6ST-2 (486 AA) présentent 24% d'homologie de séquences, la GalNAc4S-6ST (561 AA) ne présente que très peu d'homologie avec les deux autres. En revanche, elle présente 40% d'homologie avec la 3-OST3A. De manière générale, les plus fortes homologies sont retrouvées au niveau des séquences impliquées dans la fixation du PAPS et dans l'activité catalytique. Les trois 6-*O*-sulfotransférases sont toutes des protéines transmembranaires présentant une topologie de type II. Elles partagent également deux domaines de fixation du PAPS ainsi que plusieurs résidus de cystéines conservés dans les domaines catalytiques qui assurent la conformation et l'activité (Tsutsumi et al., 1998). Aucune étude structurale n'a été réalisée à ce jour, d'où l'absence de données sur les mécanismes catalytiques. La C6ST-1 transfère un groupement sulfate en C6 des résidus de GalNAc et contribue à la formation des disaccharides GlcUA-GalNAc6S et GlcUA2S-GalNAc6S (Uchimura et al., 2002). Elle a une large spécificité de substrat et est capable *in vitro* de transférer des groupements sulfates sur les chaînes non-sulfatées, 4-*O*-sulfatées, 6-*O*-sulfatées et 2,4-*O*-sulfatées, ainsi que sur les DS. Ainsi, l'existence d'une 6-*O*-sulfotransférase spécifique des DS n'a pas été encore démontrée, même si une telle activité avait été reportée dans des surnageants de culture cellulaire (Nadanaka et al., 1999; Yamada et al., 2004). Contrairement à la C6ST-1, la C6ST-2 a une spécificité de substrat bien plus étroite puisqu'elle ne peut agir que sur les chaînes non-sulfatées *in vitro* (Kitagawa et al., 2000). Cependant, l'étude de souris déficientes en C6ST-1 a montré que ces souris ne présentaient pas de phénotypes particuliers, suggérant que la C6ST-2 pouvait compenser son absence (Uchimura et al., 2002). Ces deux

enzymes auraient donc des fonctions redondantes, mais des études d'invalidation de la C6ST-2 et des deux simultanément sont nécessaires pour comprendre totalement la part des deux enzymes dans la sulfatation des CS/DS. La GalNAc4S-6ST présente également une spécificité de substrat étroite, puisqu'elle ne peut agir que sur les chaînes de CS 4-O-sulfatées (Yamauchi et al., 1999). L'invalidation du gène *Chst15* chez la Souris conduit à une disparition des CS de type E, confirmant que la GalNAc4S-6ST est la seule enzyme capable de synthétiser ce genre de motifs (Ohtake-Niimi et al., 2010). Ces souris sont cependant viables et fertiles, ce qui indique que l'absence des CS-E est probablement compensée par d'autres GAGs hautement sulfatés. Cette étude a également permis de montrer que les CS-E participe comme l'héparine à l'activation des protéases produites par les mastocytes.

Les profils d'expression des C6ST-1 et C6ST-2 sont très différents en fonction des tissus observés. La C6ST-1 est exprimée de façon ubiquitaire, avec une abondance dans le cœur, le placenta, les muscles squelettiques et le thymus. La déficience en C6ST-1 conduit à une forme de dysplasie spondylo-épiphyse héréditaire, supportant le rôle de cette enzyme dans le développement du squelette (Thiele et al., 2004). La C6ST-2, quant à elle, est particulièrement exprimée dans la rate. Elle est également très exprimée lors du développement embryonnaire avec une régulation de son expression spatio-temporelle au cours de la croissance de l'embryon (Kitagawa et al., 2000). A ce jour, peu d'études ont porté sur la distribution de la GalNAc4S-6ST. Elle serait fortement exprimée lors du développement embryonnaire (Ishii et al., 2008). Chez l'adulte, la quantité élevée de CS-E dans le cerveau et les ganglions lymphatiques suggère qu'elle serait préférentiellement exprimée dans ces tissus (Purushothaman et al., 2007). Par contre, plusieurs études ont montré que la GalNAc4s-6ST est surexprimée dans certains types de cancers. Dans les tumeurs astrocytaires, son expression est corrélée à un mauvais pronostic de survie des patients. Les auteurs de cette étude ont montré que les CS-E produits par ces cellules participent à la fixation de la midkine et de la pléiotropine, ce qui favorise leur pouvoir invasif (Kobayashi et al., 2013). De même, dans les carcinomes pulmonaires de Lewis, l'expression de la GalNAc4S-6ST est corrélée à une augmentation des métastases. Là aussi, l'inhibition de l'enzyme induit une diminution de la capacité invasive des cellules (Mizumoto et al., 2013b).

3.3.6. La 2-O-sulfotransférase

Une uronosyl 2-O-sulfotransférase (UST) catalyse le transfert d'un groupement sulfate en C2 des acides hexuroniques dans les chaînes CS/DS. Comme la GalNAc4S-6ST, elle

participe aux dernières étapes de maturation des chaînes CS/DS, puisqu'elle agit après les C4STs/D4ST et C6STs (Mikami et al., 2013b).

Le gène codant pour l'UST partage 32% d'homologie de séquence avec la 2-OST des HS, et cette homologie atteint 56% dans le domaine catalytique. Les deux protéines partagent quatre cystéines conservées qui assure la conformation du domaine catalytique (Kobayashi et al., 1999, 1996). Les deux enzymes sont également les seules sulfotransférases représentées par une seule isoforme, et elles sont très conservées entre les espèces, ainsi, l'UST (406 AA) humaine partage plus de 85% d'homologie dans son domaine catalytique avec les autres UST retrouvées chez les Vertébrés.

Les acides aminés impliqués dans l'activité catalytique ont été identifiés par mutagenèse dirigée. Le résidu His-168 est indispensable au mécanisme catalytique, alors que les résidus Arg-203, Asp-206 et Thr-321 participent à la fixation du substrat polysaccharidique. Cette étude a également souligné des différences entre l'UST et la 2-OST des HS, qui seraient à l'origine de leur spécificité de substrat respective (Xu et al., 2007). *In vitro*, l'UST agit préférentiellement sur des résidus d'IdoUA situés à proximité de GalNAc 4-*O*-sulfatés et sur des résidus de GlcUA proches de GalNAc 6-*O*-sulfatés (Kobayashi et al., 1999). Concernant les CS, une étude plus récente a confirmé que l'UST agit préférentiellement sur les chaînes déjà sulfatées, suggérant qu'elle agirait en fin de biosynthèse. Par contre, la même étude a montré que l'enzyme a une meilleure activité sur les DS non sulfatés comparativement aux DS 4-*O*-sulfatés, suggérant que la 2-*O*-sulfatation des résidus d'IdoUA puisse avoir lieu avant la 4-*O*-sulfatation des GalNAc (Ohtake et al., 2005). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre la spécificité d'action de l'UST vis-à-vis des CS et des DS.

L'UST est largement exprimée dans tous les tissus et lignées cellulaires analysés (Kobayashi et al., 1999). Cependant, peu de données sont disponibles sur la régulation de l'expression de cette enzyme. Plusieurs rôles ont également été associés aux chaînes CS/DS 2-*O*-sulfatés et donc indirectement à l'UST. Par exemple, il a été montré que les DS lient le cofacteur II, un inhibiteur de protéase agissant sur la cascade de coagulation, et que cette interaction est dépendante de la 2-*O*-sulfatation (Maimone et al., 1990). Les DS 2-*O*-sulfatés interviennent également dans la croissance des neurites, suggérant un rôle de l'UST dans le développement neuronal (Hikino et al., 2003).

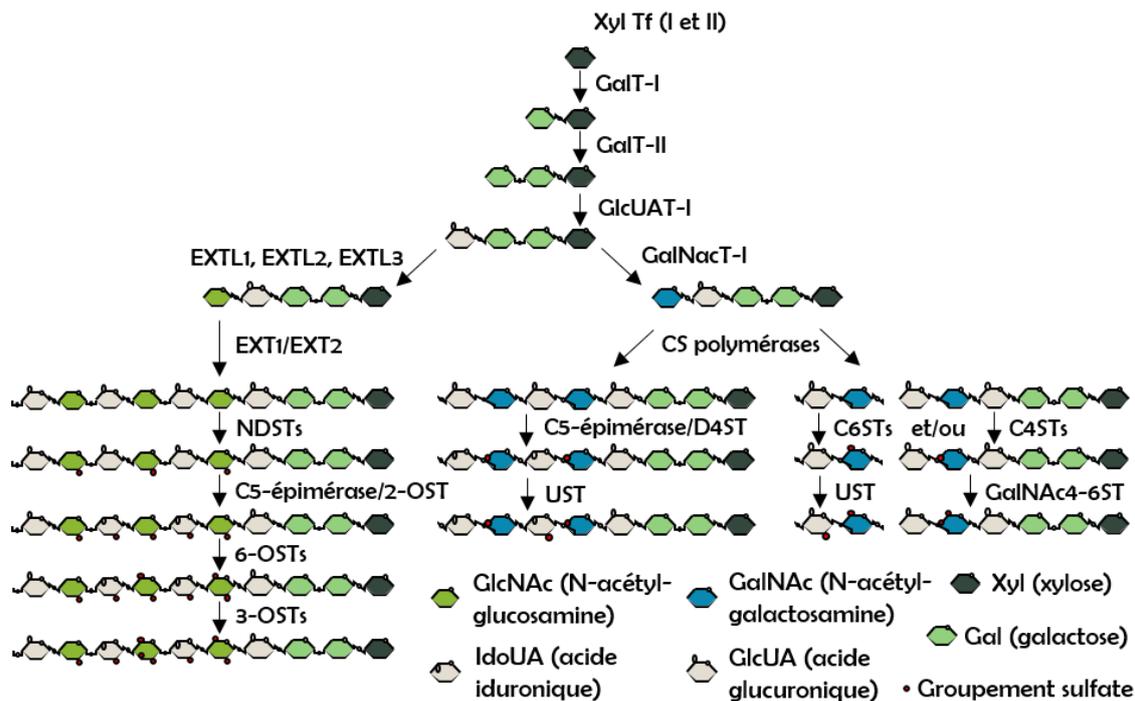


Figure 11: Biosynthèse des héparanes et chondroïtanes sulfates. (d'après (Kusche-Gullberg et al., 2003))

IV. Fonctions biologiques des HS et CS/DS

4.1. Interactions GAGs/protéines

En raison des différences observées dans l'expression et dans l'activité de leurs enzymes de biosynthèse, chaque chaîne HS ou CS/DS possède un profil de sulfatation, une taille et une structure qui sont potentiellement uniques dans chaque type cellulaire. Ces caractéristiques confèrent à ces molécules une grande hétérogénéité structurale et la possibilité d'interagir avec de nombreuses ligands protéiques (Esko et al., 2001; Lindahl et al., 1998; Ori et al., 2008; Zhang, 2010).

4.1.1. Paramètres de fixation

L'interaction entre les chaînes GAGs et les protéines s'explique principalement par des liaisons électrostatiques (Rabenstein, 2002). De manière générale, elle a lieu entre les régions anioniques des chaînes GAGs et des régions protéiques cationiques contenant des résidus d'acides aminés tels que la lysine, l'arginine ou encore l'histidine. En effet, à pH physiologique, les GAGs sont anioniques et la plupart de leurs charges négatives sont neutralisées par des ions de charge opposée. Ces contre-ions stabilisent la conformation des chaînes polysaccharidiques en réduisant les forces répulsives entre les groupements chargés négativement (sulfates,

carboxyles) au sein de la chaîne (R. E. Hileman et al., 1998). Lorsque qu'une protéine se fixe sur une chaîne GAG, ses résidus basiques remplacent les contre-ions et sont donc à l'origine de l'interaction (Mascotti et al., 1995). Cependant, plusieurs études ont suggéré que la composante ionique de l'interaction protéines/GAGs ne suffisait pas à l'expliquer en totalité. Ainsi, une étude de calorimétrie de titration isotherme a montré que dans l'interaction FGF-2/héparine, seulement 30% de l'énergie libre de fixation était due aux interactions électrostatiques, le reste étant dû à des liaisons hydrogènes et à des interactions hydrophobes (Thompson et al., 1994). Cela a d'ailleurs été confirmé par l'analyse des structures cristallines des FGF-1 et -2 complexés à l'héparine, où il a été montré que les forces de van der Waals avaient un rôle important dans les interactions (Pellegrini et al., 2000; Schlessinger et al., 2000).

L'importance de la composante ionique dans l'interaction protéines/GAGs a conduit à considérer le rôle de la présence de cations libres dans la formation de la liaison. Il a d'ailleurs été montré que la présence de cations (notamment le zinc et le cuivre) favorise la fixation de nombreuses protéines, telles que le précurseur bêta-amyloïde, l'interleukine-5, le prion, le second cofacteur de l'héparine ou encore l'endostatine (Eckert et al., 2003; González-Iglesias et al., 2002; Ricard-Blum et al., 2004). Les mécanismes ne sont pas complètement élucidés, mais il a été suggéré que les cations libres pouvaient agir directement sur les protéines et favoriser leur oligomérisation, ce qui dans certains cas favorise l'interaction avec les chaînes GAGs (González-Iglesias et al., 2002). Les cations pourraient aussi jouer un rôle sur la conformation des protéines et ainsi favoriser leur fixation (Eckert et al., 2003). Enfin, la présence de cations libres influencerait également sur la conformation des chaînes GAGs elles-mêmes et ainsi moduler les interactions avec les protéines. *In vivo*, la régulation des interactions entre GAGs et protéines peut d'ailleurs être assurée par la concentration locale en ions divalents. Il a en effet été montré que la forte concentration en Zn^{2+} dans les plaquettes influence l'affinité et la spécificité de nombreuses interactions entre protéines et GAGs (Coombe et al., 2005).

La structure tridimensionnelle des chaînes GAGs a également un rôle important dans l'interaction avec les protéines. L'héparine, par exemple, présente une structure tridimensionnelle hélicoïdale. Cependant, une certaine flexibilité existe dans la chaîne glycanique, en grande partie causée par la présence des résidus IdoUA. En effet, alors que les GlcUA ne peuvent adopter qu'une seule conformation (1C4), les IdoUA sont quant à eux capables d'adopter plusieurs conformations (1C4, 4C1, 2S0). Le passage de l'une des conformations à l'autre nécessite peu d'énergie (Capila et al., 2002). En outre, certaines modifications de l'héparine peuvent influencer sur la conformation des résidus IdoUA. Ainsi, la 6-

O-sulfatation des résidus de GlcN favorise la conformation 2S0 des résidus IdoUA (Murphy et al., 2008). Les liaisons glycosidiques sont quant à elles plus rigides et de ce fait, la conformation des résidus IdoUA n'influence que très légèrement la structure générale des chaînes d'héparine (Mulloy et al., 2000; Sasisekharan et al., 2006). Par contre, la conformation des résidus IdoUA influe énormément sur l'orientation des groupements sulfates et carboxyles, ce qui peut aussi moduler la fixation des protéines (Coombe et al., 2005). Moins d'informations sont disponibles quant à la structure tridimensionnelle des autres GAGs et leur implication dans la formation de liaisons avec les protéines. On peut cependant supposer que les régions NS des HS, très proches structurellement de l'héparine, adoptent une structure similaire. En revanche, pour les autres régions des HS et pour les CS/DS, l'étude spécifique de leur structure sera nécessaire afin de comprendre au mieux leurs interactions avec les protéines.

Etant donné que la majorité des études a été réalisée avec l'héparine, les domaines d'interaction entre protéines et GAGs ont été nommés « Heparin-Binding Domains » (HBD) (Gandhi et al., 2008). Ils sont composés d'un grand nombre de résidus basiques et, à ce jour, trois types de séquences consensus ont été décrits dans la majorité des ligands protéiques : -XBBXBX-, -XBBBXXBX- et -XBBBXXBBBXXBBX-, où X représente un acide aminé hydrophobe et B un résidu basique (Gandhi et al., 2008; R. E. Hileman et al., 1998). La structure de ces séquences consensus a été modélisée et il apparaît qu'elles adoptent une conformation dans laquelle les acides aminés basiques sont réunis à l'extérieur de la protéine alors que les autres résidus s'orientent vers l'intérieur, facilitant ainsi l'interaction entre les résidus basiques des protéines et les groupements anioniques du polysaccharide (R E Hileman et al., 1998).

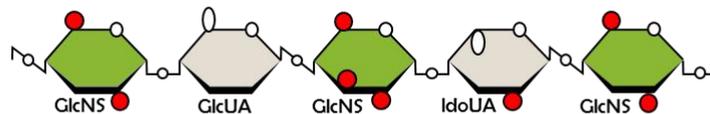
Les modifications de pH ont également une grande influence sur la fixation de protéines sur les chaînes de GAGs (Coombe et al., 2005). Cette caractéristique n'est pas à négliger puisque *in vivo*, des variations de pH ont lieu dans de nombreux phénomènes physiopathologiques. Ainsi, la réponse inflammatoire conduit à une acidification locale en raison notamment de la production d'acide lactique par les neutrophiles (Lardner, 2001). De même, le métabolisme des cellules cancéreuses peut conduire à une baisse de pH locale (Helmlinger et al., 1997). L'interaction entre les chaînes GAGs et les protéines pourrait donc être largement modifiée dans ces conditions. Ainsi, il a été montré que le peptide β -amyloïde, le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*), le VEGF, la chimiokine SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor-1*), la molécule d'adhérence PECAM (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*) ou encore la L-sélectine interagissent différemment avec les GAGs en fonction du pH (Coombe et al., 2008; Hirose et al., 2011; Veldkamp et al., 2005). L'effet du pH sur les interactions GAGs/protéines est surtout marqué lorsque la liaison engage

des His. En effet, ces dernières présentent un pKa proche de 6 et se protonent dès que le pH physiologique diminue, ce qui favorise la formation de liaisons électrostatiques avec les GAGs (Gandhi et al., 2008).

4.1.2. Spécificité des interactions

Dans de nombreux exemples, les interactions GAGs/protéines apparaissent peu spécifiques. Toutefois, des liaisons plus spécifiques, dépendantes de la composition en disaccharides, des profils de sulfatation des GAGs ou encore de l'arrangement des domaines NA et NS dans les chaînes HS ont été décrites pour certains ligands protéiques (Lindahl et al., 1998; Turnbull et al., 2001). Ainsi, une séquence spécifique de fixation pour une protéine serait définie par la densité en groupements sulfates et leur répartition au sein des chaînes de GAGs (Capila et al., 2002; Esko et al., 2001, 2002). Le meilleur exemple de ce type de spécificité est celui de l'AT-III. Cette protéine reconnaît un pentasaccharide de type HS contenant un groupement 3-O-sulfate sur le résidu central de GlcNS et un résidu GlcUA adjacent, et seul ce pentasaccharide peut induire un changement de conformation de l'AT-III nécessaire à son activité anticoagulante (Olson et al., 2002b) (Figure 12).

A. Pentasaccharide d'héparine reconnu par l'antithrombine-III



B. Changement conformationnel de l'AT-III induit par la fixation d'un pentasaccharide héparinique

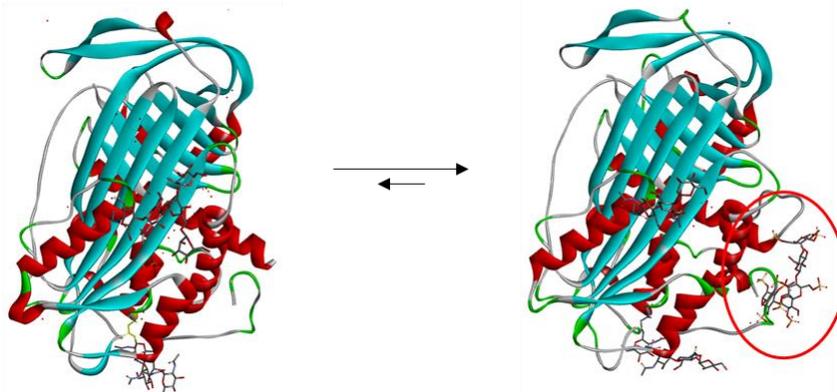


Figure 12: Spécificité de fixation entre l'antithrombine-III (AT-III) et le pentasaccharide héparinique. (A) Séquence du pentasaccharide reconnu par l'AT-III. (B) La fixation du pentasaccharide spécifique de l'AT-III induit un changement de conformation de cette dernière, ce qui permet l'interaction avec la thrombine et son inhibition. La zone d'interaction entre le pentasaccharide héparinique et l'AT-III est entourée en rouge.

Les interactions entre les membres de la famille FGF et les chaînes GAGs ont été largement étudiées. Il a ainsi été montré que les FGF-1 et -2 se lient à des motifs HS contenant des résidus IdoUA2S et GlcNS. La 6-*O*-sulfatation est également nécessaire à la fixation du FGF-1 alors qu'elle n'est pas indispensable à celle du FGF-2 (Guerrini et al., 2002). Toutefois, les groupements 6-*O*-sulfates sont requis pour l'activité de ce facteur, puisqu'ils participent à la formation du complexe de signalisation avec son récepteur (Pye et al., 1998). L'importance du positionnement des groupements sulfates a également été démontrée pour de nombreuses autres protéines.

La taille des motifs glycaniques est également un critère important pour expliquer la fixation de nombreux ligands protéiques. Cependant, la taille requise pour la fixation d'un ligand protéique ne correspond pas nécessairement à la taille de l'oligosaccharide induisant une activité biologique. Par exemples, les HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) et FGF-2 se fixent sur des tétrasaccharides, mais des oligosaccharides de degré de polymérisation 10 (Dp10) sont requis pour l'activité biologique (Delehedde et al., 2002a, 2002b). Les interactions avec les HS peuvent également être dépendantes de la distribution des séquences NA et NS, comme cela a été montré pour l'IL-8, l'IFN- γ , le PF4 (*Platelet Factor 4*), le TGF- β ou encore MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein-1 α*) (Lortat-Jacob et al., 1995; Spillmann et al., 1998; Stringer et al., 2002). Dans ces cas-là, la flexibilité des domaines NA permet l'interaction simultanée de deux domaines NS et induit ainsi la dimérisation du ligand. L'IL-8, par exemple, reconnaît des disaccharides trisulfatés IdoUA2S-GlcNS6S localisés dans des hexasaccharides de type NS, mais sa dimérisation nécessite que ces motifs soit séparés par au moins sept unités disaccharidiques de type NA (Pichert et al., 2012).

La spécificité d'interaction des chaînes GAGs peut donc être un système de régulation cellulaire vis-à-vis de nombreux ligands protéiques. En effet, les modifications des chaînes GAGs apportées par la cellule au cours des processus physiopathologiques vont lui permettre de moduler ses propriétés à répondre à de nombreux médiateurs extracellulaires (Zhang, 2010).

4.2. Processus biologiques médiés par les GAGs

Plus d'une centaine de protéines ont été caractérisées comme étant capables d'interagir avec les GAGs. Parmi elles, on retrouve des protéines de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, des inhibiteurs de protéases ou encore des protéines virales. *Via* la liaison à ces protéines, les GAGs participent à leur activité et sont des régulateurs centraux dans de nombreux processus physiopathologiques (Bishop et al., 2007; Kirkpatrick et al., 2007; Lindahl et al., 2009; Mikami et al., 2013b; Thelin et al., 2013; Zhang, 2010).

4.2.1. Organisation de la matrice extracellulaire

Une part importante des GAGs se retrouve localisée dans les matrices extracellulaires sous forme de protéoglycanes. Ils y exercent des fonctions dans l'organisation de ces matrices et participent également à l'adhérence cellulaire.

Les GAGs ont un rôle très important dans les tissus cartilagineux. Ils participent notamment à leur hydratation, offrent une résistance mécanique face aux forces de compression et maintiennent leurs propriétés rhéologiques. Cela est possible grâce à leur organisation, à la capacité à lier une grande quantité d'eau et aux interactions qu'ils engagent avec de nombreux partenaires des matrices extracellulaires (Chen et al., 2013; Scott, 2001). En effet, les HS fixent de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, les laminines ou les collagènes. La fibronectine est capable de se lier aux HS *via* son domaine HepII, localisé dans son extrémité C-terminale (Echtermeyer et al., 1999). De nombreux domaines de fixation aux HS et aux CS sont aussi présents sur les laminines, le module LG4 situé dans le domaine globulaire N-terminal des chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ des laminines constituant le site de plus haute affinité pour les HS (Matsuura et al., 2004; Utani et al., 2001). Les HS et les DS interagissent également avec de nombreux types de collagènes (Delehedde et al., 2001). Toutes ces interactions font partie intégrante de l'organisation de la matrice extracellulaire et ont un rôle majeur dans l'adhérence cellulaire.

En plus de ces fonctions principales, les GAGs des matrices extracellulaires jouent un rôle important dans la migration cellulaire et servent de réservoirs de stockage pour de nombreuses molécules sécrétées, telles que des facteurs de croissance, des chimiokines, des cytokines ou des protéases. En liant ces médiateurs extracellulaires, les GAGs vont les protéger des dégradations enzymatique ou chimique (Schultz et al., 2009). Cette fonction de réservoir permet également de localiser et de limiter la diffusion des molécules stockées (Lyon et al., 1997; Webb et al., 1993). Piégés dans la matrice, ces facteurs vont ensuite être libérés et pouvoir agir de façon ciblée et donc plus efficace sur leur environnement direct. Le relargage de ces facteurs stockés se produit notamment lors du remodelage tissulaire. Par exemple, les facteurs de croissance tels que les FGFs et les VEGFs sont stockés, stabilisés et protégés de la dégradation grâce aux interactions avec des chaînes GAGs. En réponse à des stimuli particuliers, tels que l'hypoxie, ces facteurs sont libérés et peuvent ainsi exercer leurs fonctions angiogéniques. Ce processus, qui a lieu en condition physiologique, est amplifié lors de phénomènes biologiques fondamentaux tels que la morphogenèse ou dans des pathologies impliquant un remodelage intense des tissus comme le cancer et les maladies inflammatoires (Bame, 2001; Vlodavsky et al., 2001).

Deux types d'enzymes sont à l'origine de la libération de ces facteurs : les héparanases, qui coupent les chaînes HS et des protéases, majoritairement des métalloprotéinases, qui clivent la partie protéique des protéoglycanes (Bame, 2001; Götte, 2003; Quaranta, 2000). En outre, les protéoglycanes solubles libérés par shedding ont les mêmes propriétés de fixation que leurs précurseurs membranaires : ils peuvent ainsi réguler la fixation des ligands à la surface cellulaire ainsi que leur stabilisation. Toutefois, ces formes solubles peuvent également entrer en compétition avec les GAGs de surface pour la fixation de facteurs solubles et dans ce cas, inhiber les fonctions membranaires (Tumova et al., 1999).

4.2.2. Migration cellulaire

La famille des chimiokines est particulièrement impliquée dans le processus de migration cellulaire. Plus de 50 membres composent cette famille qui est subdivisée en quatre classes (C, CC, CXC, CX3C) en fonction de l'arrangement d'un motif conservé riche en cystéines localisé dans leur région N-terminale. La quasi-totalité des chimiokines interagit avec les GAGs, notamment les HS (Hamel et al., 2009; Wang et al., 2013).

Chez l'adulte, peu de cellules sont capables de se mouvoir et de migrer, à l'exception des cellules du système immunitaire. D'ailleurs, la formation d'un gradient de chimiokines et leur présentation à la surface luminale des cellules endothéliales sont les deux événements cruciaux pour le recrutement des leucocytes circulants sur le site de l'inflammation (Parish, 2006). Plusieurs études ont montré le rôle prépondérant des GAGs dans la formation de ce gradient et l'activité des chimiokines (Proudfoot et al., 2003; Wang et al., 2013). Par exemple, il a été démontré que la mutation des domaines d'interaction de trois chimiokines (MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant protein 1*), MIP-1 β et RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*)) avec les GAGs avait pour effet d'inhiber leur fonction chimio-attractante *in vivo*. Des résultats identiques ont été reportés plus récemment avec des souris présentant des altérations structurales des HS. Le rôle des GAGs exprimés à la surface des cellules endothéliales serait donc d'empêcher la dilution dans le flux sanguin des chimiokines et de permettre la formation d'un gradient solide chimio-attractant pour les leucocytes.

En solution, les chimiokines s'organisent sous forme de structures oligomériques. Les GAGs ont un rôle particulier dans ce processus, puisqu'ils favorisent cette oligomérisation *in vitro* (Imberty et al., 2007). Il a d'ailleurs été montré que les cellules T cytotoxiques sécrètent des complexes multimériques de chimiokines de type CC associées à des protéoglycanes (Wagner et al., 1998). L'étude de Proudfoot et al. (2003) souligne également l'importance de ce processus *in vivo*, puisqu'elle montre que les mutants des chimiokines, bien que

complètement actifs *in vitro*, ne sont plus capables de recruter les leucocytes dans un modèle *in vivo*. La fixation aux GAGs et la possibilité de former des oligomères sont donc indispensables à l'activité de nombreuses chimiokines *in vivo*, même si ce mécanisme ne semble pas nécessaire *in vitro*. Il a donc été suggéré que la formation de complexes avec les GAGs permettrait d'augmenter la concentration locale des chimiokines à la surface cellulaire. L'oligomérisation pourrait également modifier leur conformation, ce qui aurait pour effet d'exposer de nouveaux sites de fixation aux récepteurs.

4.2.3. *Activité anticoagulante*

L'héparine possède une activité anticoagulante puissante, associée à sa capacité de fixer l'AT-III. Ce mécanisme est la première interaction GAGs/protéine à avoir été caractérisée, faisant de l'AT-III le prototype des *Heparin Binding Proteins* (HBPs) (Olson et al., 2010; Petitou et al., 2003). L'AT-III est une serpine, autrement dit un inhibiteur de protéases à sérine, qui est impliquée dans la régulation de la cascade de coagulation. La première étude sur l'interaction entre l'AT-III et l'héparine suggérait que la fixation de l'héparine sur l'AT-III entraîne un changement conformationnel de la protéine, lui permettant d'exercer son activité d'inhibiteur envers les protéases de la cascade de coagulation comme la thrombine ou le facteur Xa (Rosenberg et al., 1973). Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés sur ce mécanisme, et il est maintenant établi que le changement conformationnel de l'AT-III provoqué par la fixation de l'héparine expose une boucle réactive de l'AT-III impliquée dans la reconnaissance, et donc l'inhibition, des protéases à sérine (Olson et al., 2002a; Whisstock et al., 2000).

4.2.4. *Participation aux complexes de signalisation*

A l'instar des chimiokines, de nombreux facteurs extracellulaires ont leur activité régulée par les GAGs membranaires. En effet, la plupart des HBPs sont capables d'interagir d'une part avec les GAGs localisés à la surface des cellules et d'autre part avec leur récepteur protéique spécifique. Le plus souvent, les deux sites d'interaction sont localisés sur des régions distinctes des ligands, suggérant que les GAGs interviennent dans un système de présentation aux récepteurs fonctionnels et de stabilisation des complexes de signalisation (Capila et al., 2002; Turnbull et al., 2001).

Les interactions entre les FGFs et les GAGs ont été largement étudiées. Bien que la majorité des ligands soient capables d'interagir avec leurs récepteurs en absence de GAGs, la présence de ces derniers stabilise les complexes et autorise la mise en place d'un signal soutenu nécessaire pour les activités biologiques (Delehedde et al., 2000). Il a par exemple été montré dans des cellules ne présentant pas d'HS de surface que le FGF-2 peut se fixer sur son récepteur

et générer des signaux intracellulaires. Cependant, ces signaux ne suffisent pas à induire la prolifération des cellules. Mais la réponse mitogène attendue peut être restaurée par addition de fragments d'héparine solubles (Delehedde et al., 2000). Les chaînes HS apparaissent donc indispensables à la présentation du FGF-2 à son récepteur. A ce jour, de nombreuses controverses subsistent encore au sujet de la formation et de la stœchiométrie des complexes FGFR/FGF/héparine. Il est cependant admis qu'il y a formation d'un complexe FGF(2)/FGFR(2), qui nécessite d'être stabilisé par une ou deux chaînes de GAGs (Mohammadi et al., 2005a, 2005b). Par exemple, une première étude de la structure cristalline du FGF-1 en complexe avec son récepteur FGFR2 et des fragments d'HS (dp10) a montré la formation d'un complexe asymétrique où deux facteurs de croissance liés à deux récepteurs s'assemblent autour d'une seule chaîne oligosaccharidique. Dans ce modèle, l'oligosaccharide engage des contacts avec les deux molécules de FGF-1 mais seulement avec l'un des récepteurs (Pellegrini et al., 2000). La seconde étude structurale s'est intéressée au complexe FGF-2/FGFR1 et montre qu'il y a formation d'un complexe symétrique comportant deux facteurs de croissance, deux récepteurs et deux chaînes hépariniques. Ici, les deux chaînes d'héparine établissent de nombreux contacts avec les FGF-2 et FGFR1 (Schlessinger et al., 2000) (Figure 13). D'autre part, il a été montré que le profil de sulfatation des chaînes HS à un rôle prépondérant pour la formation des complexes de signalisation des FGFs. Ainsi, les groupements *N*-, 2-*O*- et 6-*O*-sulfates sont requis pour induire la transduction des signaux intracellulaires, alors que seuls les groupements *N*- et 2-*O*- sulfates sont nécessaires à la fixation du FGF-2 sur les GAGs (Guerrini et al., 2007; Hricovíni et al., 2002).

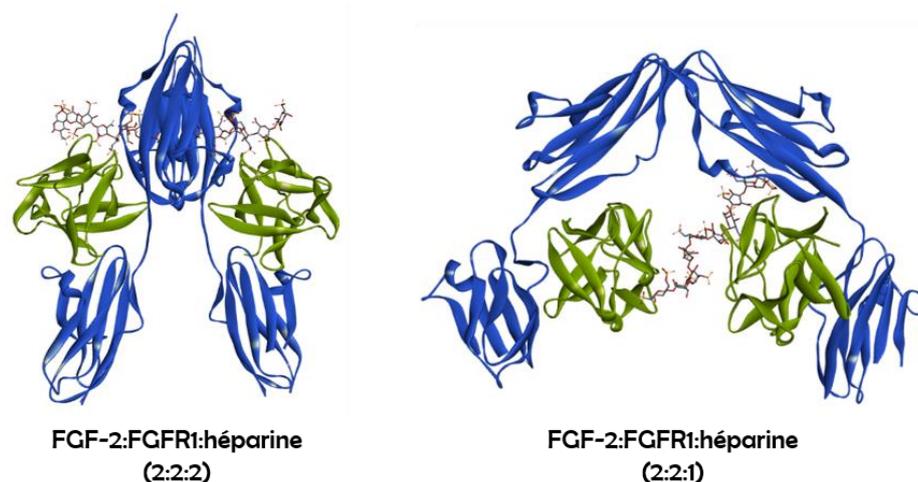


Figure 13: Structure des complexes ternaires (FGF-2:FGFR1:héparine). Les facteurs de croissance sont représentés en vert et leurs récepteurs en bleu. Les chaînes d'héparine sont représentées en modèle en bâtons. (d'après Schlessinger et al., 2000 et Pellegrini et al., 2000)

De nombreux autres médiateurs extracellulaires nécessitent la présence de GAGs pour assurer leur activité (Zhang, 2010). Par exemple, la famille des morphogènes Wnt nécessite la présence de GAGs pour activer leurs récepteurs (Lin, 2004). Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'importance des GAGs dans l'activité de ces facteurs. Dans le premier, les GAGs servent à fixer les morphogènes et à éviter leur diffusion, ce qui a pour effet d'augmenter leur concentration locale et d'assurer leur fixation sur leurs récepteurs (Häcker et al., 1997; Pfeiffer et al., 2002). Dans le second modèle, les GAGs serviraient de corécepteurs et participeraient directement à la formation des complexes de signalisation (Gerlitz et al., 2002; Lin et al., 1999). Toutefois, il a été démontré que les Sulfs, en éliminant les groupements 6-*O*-sulfates des HS, modifie l'affinité des facteurs Wnt pour les HS. Ce mécanisme aurait pour effet de libérer les ligands concentrés à la membrane et de permettre leur interactions avec leurs récepteurs de signalisation (Ai et al., 2003; Ohto et al., 2002).

4.2.5. Internalisation de protéines

Les protéoglycanes membranaires participent à la fixation puis à l'internalisation de nombreux ligands extracellulaires. En effet, lors du recyclage des protéoglycanes, les protéines liées aux chaînes de GAGs sont co-internalisées. Ainsi l'AT-III, le complexe follistatine/activine, la vitronectine, la thrombospondine, le FGF-2, la lipoprotéine lipase ou certaines LDLs (*Low Density Protein*) peuvent être internalisés *via* ce processus (Bernfield et al., 1999). Ce mécanisme a été très étudié dans les voies de clairance des LDLs (Mahley et al., 1999). Ainsi, l'invalidation de la NDST1 dans les hépatocytes de Souris réduit leur propriété à capter les lipoprotéines riches en triglycérides et en cholestérol (Bishop et al., 2008; MacArthur et al., 2007). L'invalidation de la 2-OST conduit au même effet, alors que l'absence de 6-*O*-sulfatation n'a aucun effet, ce qui indique que la clairance des lipoprotéines par le foie est dépendante de la position des groupements sulfates dans les chaînes HS (Stanford et al., 2010).

En parallèle de leur fonction de récepteurs d'endocytose pour de nombreux ligands protéiques, il a récemment été démontré que les protéoglycanes de surface interviennent également dans le trafic de complexes macromoléculaires, tels que les exosomes (Christianson et al., 2014). Depuis quelques années, un intérêt particulier est porté au rôle des microvésicules dans le transfert intercellulaire d'ARNm, de microARN ou de protéines de signalisation (Svensson et al., 2011; Théry et al., 2009). Ce phénomène est notamment impliqué dans la régulation du système immunitaire, l'athérosclérose et le développement tumoral. Les mécanismes relatifs à la réception de ces vésicules extracellulaires ne sont pas complètement compris. Cependant, une étude récente a suggéré un rôle particulier des protéoglycanes dans

l'internalisation des exosomes. Ces travaux ont montré que l'élimination des HS membranaires diminue la quantité d'exosomes captée par les cellules. En outre, les exosomes se retrouvent associés à des vésicules riches en syndécans et en glypicans, ce qui indique que les protéoglycanes agissent comme récepteurs d'internalisation et non comme simples sites d'attachement aux cellules (Al-Nedawi, 2014; Christianson et al., 2013).

4.2.6. Fixation d'agents pathogènes

De nombreux agents pathogènes utilisent les GAGs localisés à la membrane des cellules comme porte d'entrée. Même si quelques exemples ont été reportés pour des bactéries (*Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus* ou *Helicobacter pylori*) (Bernfield et al., 1999) ou des parasites (*Plasmodium falciparum*) (Barragan et al., 1999; Frevert et al., 1993), la majeure partie des pathogènes utilisateurs de GAGs comme porte d'entrée sont les virus, tels que HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), HCV (*Hepatitis C Virus*), herpes-virus, cytomégalovirus, virus de la vaccine, picornavirus, échovirus et certains papillomavirus, poxvirus et adénovirus (Germi et al., 2001; Spillmann, 2001; Vivès et al., 2006). Dans la plupart des cas, l'interaction avec les protéoglycanes constitue l'étape préalable à la fixation du virus sur ses récepteurs cellulaires. Cette interaction peut cependant être une étape critique de l'entrée du virus, en favorisant par exemple les étapes de fusion membranaire, tel que cela a été décrit dans le cas du HSV-1 (Campadelli-Fiume et al., 2007; Shukla et al., 1999).

La spécificité d'interaction entre les protéines de capsid et les GAGs a été étudiée dans de nombreux exemples d'infection virale. Par exemple, il a été établi pour HSV-1 que le motif HS de fixation de la protéine gD est un octasaccharide contenant une GlcN sulfatée en C3 et liée à un résidu IdoUA2S. Ainsi, la seule introduction de vecteurs d'expression codant pour les 3-OST2, 3A, 3B, 4 ou 6 dans des cellules non permissives est suffisante pour qu'elles deviennent susceptibles à l'infection par HSV-1. En revanche, l'expression de la 3-OST1 n'a aucun effet sur l'entrée du virus (O'Donnell et al., 2010; Shukla et al., 1999). Pour HIV-1, l'interaction avec les GAGs est dépendante de la protéine gp120, qui possède des résidus d'arginine sur sa boucle V3 capables d'interagir avec différents types de GAGs (Roderiquez et al., 1995; Vives, 2005)

Chapitre 2 : Le rôle du système immunitaire dans les cancers

Des mutations génétiques alliées à des facteurs environnementaux sont souvent associées au phénomène de transformation cellulaire puis au développement d'une tumeur. Dans ce contexte, les travaux de Hanahan and Weinberg (Hanahan et al., 2000) ont retenu six critères généraux pour définir une cellule cancéreuse : (1) elle produit ses propres signaux de croissance, (2) elle est capable d'échapper à la mort cellulaire, (3) elle ignore les signaux d'inhibition de croissance, (4) elle peut se multiplier indéfiniment, (5) elle favorise l'angiogenèse et enfin (6) elle peut envahir les autres tissus *via* la circulation générale et/ou par effraction de la membrane basale.

Le concept d'immunosurveillance anti-tumorale est apparu dans les années 1970 pour décrire les mécanismes de défense de l'hôte impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales (Burnet, 1970). Toutefois, les tumeurs apparaissent chez les patients dont le système immunitaire fonctionne parfaitement, ce qui suggère une défaillance du système de défense ou un échappement des cellules tumorales à ces mécanismes de défense. Ces observations ont suggéré que la croissance tumorale n'est pas liée seulement à un dysfonctionnement cellulaire mais également à des interactions avec l'hôte, et en particulier avec son système immunitaire (Dunn et al., 2002). Aux six critères définissant une cellule cancéreuse ont donc été ajoutés : (1) la capacité d'échapper au système immunitaire et (2) la capacité d'induire un état d'inflammation chronique qui favorise la croissance tumorale (Hanahan et al., 2011).

Le système immunitaire peut intervenir à trois niveaux dans la prévention des tumeurs cancéreuses : (1) il protège l'organisme contre les tumeurs viro-induites en prévenant les infections virales ; (2) en contrôlant la résolution rapide des phénomènes inflammatoires, il évite les risques de tumorigenèse ; (3) il est capable d'identifier et de détruire les cellules tumorales, *via* la reconnaissance d'antigènes produits par les cellules tumorales. Ce phénomène est appelé immunosurveillance anti-tumorale. Malgré cette surveillance, certaines cellules tumorales peuvent se développer. Le concept d'immunosurveillance a donc été redéfini, laissant place à la théorie de l'immuno-édition, qui définit les relations entre cellules transformées et système immunitaire selon trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Quezada et al., 2011). Plus récemment, de nouvelles données ont élargi ce concept en suggérant la participation du système immunitaire à la progression tumorale. Ainsi, après l'échappement à la surveillance de l'hôte, les cellules cancéreuses peuvent sous certaines conditions

« reprogrammer » les cellules immunitaires environnantes afin qu'elles les protègent de l'élimination. Il a par exemple été montré que certains médiateurs produits par les cellules tumorales peuvent cibler les macrophages et induire un phénotype anti-inflammatoire. Ces macrophages vont alors synthétiser des facteurs de croissance et des protéases qui vont agir directement sur la progression tumorale, ainsi que des molécules anti-inflammatoires qui induiront un environnement immuno-tolérant et bloqueront l'action des autres cellules du système immunitaire (Lakshmi Narendra et al., 2013).

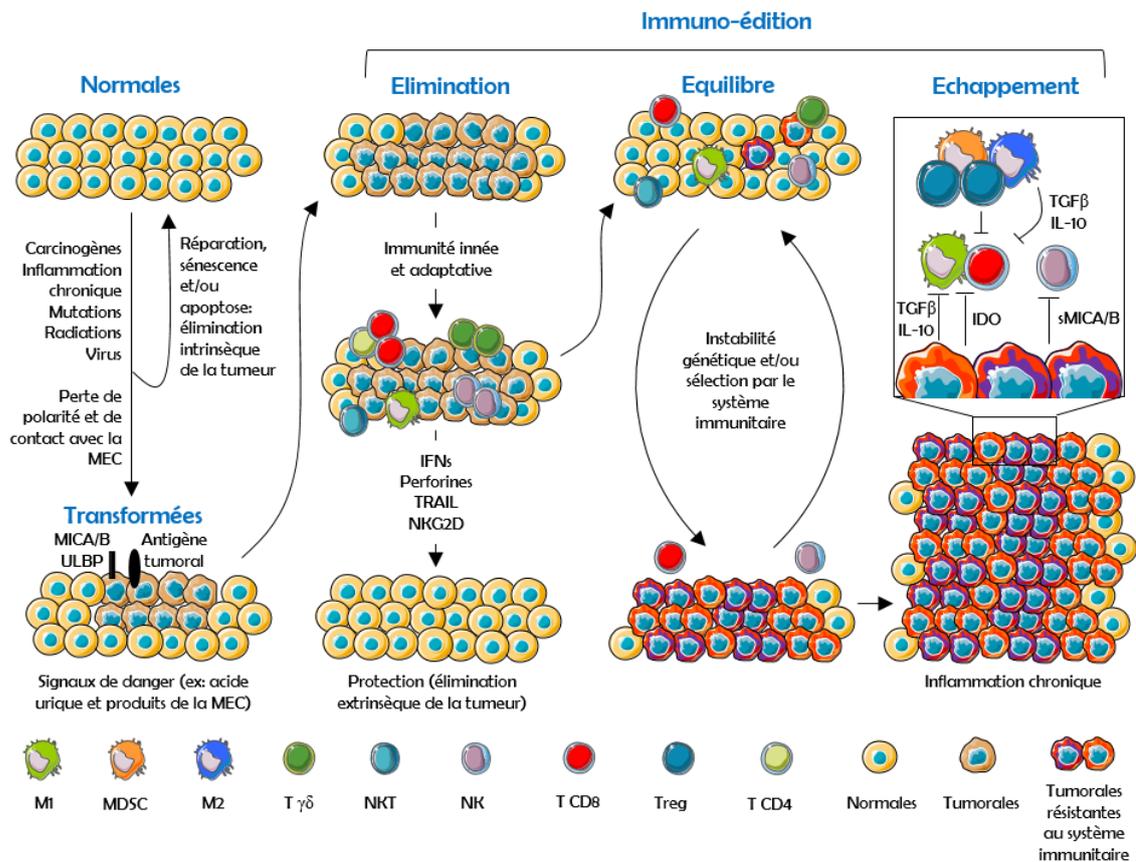


Figure 14: Théorie de l'immuno-édition. Les cellules transformées ayant échappé au contrôle intrinsèque sont prises en charge par le système immunitaire qui les élimine avant que la tumeur soit apparente. Cette phase d'élimination fait partie d'un mécanisme plus large appelé immuno-édition. Ce dernier est composé de trois phases: élimination, équilibre et échappement. Ces phases ont été appelées les trois « E » de l'immuno-édition des cancers. IDO, indoléamine 2,3-dioxygénase; MICA/B, *MHC class I chain-related antigens*; sMICA/B, *soluble MICA/B*; ULBP, *UL 16-binding protein*. (d'après (Swann et al., 2007))

I. Les cellules de l'immunité tumorale

Comme toute réponse immunitaire, la réponse anti-tumorale se traduit par l'activation de deux systèmes de défense : une réponse innée qui constitue la première ligne de défense, et une réponse spécifique ou adaptative impliquant des réponses humorales et des réponses à

médiation cellulaire. Les cellules cancéreuses sont des cellules du soi et, de ce fait, très faiblement inductrices d'une réponse immune adaptative. Le rôle des cellules présentatrices d'antigène est donc crucial pour activer les cellules effectrices du système adaptatif et développer une réponse efficace contre les cellules tumorales (Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011).

1.1. Les cellules du système immunitaire inné

L'immunité innée est une réponse immédiate vis-à-vis des agents pathogènes. Elle fait intervenir des barrières cellulaires physiques, telles que les epithelia, plusieurs types de cellules immunitaires et de nombreux médiateurs solubles. La réponse innée a pour objectif d'éliminer les substances étrangères en les tuant et/ou les phagocytant. Parmi les cellules effectrices de cette phase, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) vont présenter des antigènes aux cellules du système adaptatif et initier la seconde phase efficace qui est la réponse adaptative (Maruyama et al., 2011; Vesely et al., 2011).

Les cellules de l'immunité innée reconnaissent les éléments étrangers grâce à de nombreux récepteurs spécialisés. Par exemple, les corps apoptotiques, les débris cellulaires ainsi que certains antigènes solubles issus de la mort des cellules tumorales sont pris en charge par les CPA *via* des mécanismes tels que l'endocytose, la phagocytose ou la macropinocytose. Les mécanismes d'endocytose et de phagocytose font intervenir des récepteurs d'opsonisation, qui lient les fragments Fc γ des immunoglobulines et les facteurs du complément, des récepteurs de type lectines C (CLR), les récepteurs scavengers ou encore des protéoglycanes membranaires. La macropinocytose, quant à elle, ne met pas en jeu de récepteurs particuliers (Bohdanowicz et al., 2013).

Afin de présenter correctement les antigènes aux cellules du système adaptatif, les CPA doivent être activées par un second signal provenant du pathogène ou de la cellule tumorale. Ce signal est reconnu lui aussi par des récepteurs particuliers, que l'on nomme les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Ces derniers ont été classés en trois sous-familles : les récepteurs d'endocytose (CLR, *scavengers receptors*), les récepteurs des familles TLR et NLRs (*Nod-like receptors*), et les récepteurs solubles (collectines, ficolines, pentraxines). Ces récepteurs sont tous retrouvés sur les CPA et reconnaissent des structures communes à différentes classes de pathogènes, nommées PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Patterns*). Ils sont également capables d'interagir avec certaines molécules provenant de cellules mortes, mourantes ou souffrantes appelées DAMP (*Danger associated Molecular Patterns*). La fixation de ces signaux va aboutir à l'activation de voies de signalisation qui conduiront elles-mêmes à la

production de cytokines inflammatoires, à la migration cellulaire et à l'expression de molécules de co-stimulation permettant aux CPA de présenter les antigènes (Tang et al., 2012).

En plus de leur rôle de sentinelle et d'élimination des pathogènes, les cellules de l'immunité innée participent donc directement à la lutte contre les tumeurs, *via* leur activité cytotoxique et leur capacité à produire des cytokines inhibitrices de la croissance tumorale et de l'angiogenèse. Parmi ces cellules, on retrouve les neutrophiles, les cellules NK, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et bien qu'elles soient souvent classées dans le système adaptatif, les cellules NKT (*Natural Killer T*) et $T\gamma\delta$. Par ailleurs, d'autres cellules non leucocytaires, telles que les cellules endothéliales et épithéliales, ainsi que les fibroblastes, participent également au contrôle de la croissance tumorale. Toutefois, en fonction de l'environnement tumoral et du type de cancer, certaines cellules comme les macrophages et les cellules myélosuppressives, vont exercer une action antagoniste et favoriser la croissance tumorale (Vesely et al., 2011).

1.1.1. Les neutrophiles

Les leucocytes polymorphonucléaires ou neutrophiles sont caractérisés par un noyau polylobé et de nombreux granules cytoplasmiques. Ils se différencient dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques sous l'action de différentes cytokines, principalement le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*). Une fois en circulation, les neutrophiles survivent en moyenne une dizaine d'heures (Kolaczowska et al., 2013).

En condition physiologique normale, les interactions entre neutrophiles et cellules endothéliales sont faibles. Pour passer de la circulation sanguine à la tumeur, les neutrophiles doivent donc être activés, ce qui provoque leur arrêt sur l'endothélium et leur extravasation. Ces étapes sont dépendantes des interactions avec les PAMP, DAMP et certaines chimiokines, et nécessitent l'intervention des sélectines, qui vont créer des points d'ancrage par liaison avec des glycanes membranaires (Borregaard, 2010; Witko-Sarsat et al., 2000). Il a été ainsi démontré chez la Souris que la structure des HS peut influencer directement sur le recrutement des neutrophiles. En effet, l'infiltration des neutrophiles est bloquée lorsque la réaction de *N*-sulfatation des HS est inhibée par invalidation de la NDST1 (Wang et al., 2005). A l'inverse, l'invalidation de *HS2ST1* conduit à une augmentation du recrutement neutrophile. Toutefois, cet effet serait lié à une augmentation des réactions de *N*- et 6-*O*-sulfatations des HS dans les souris déficientes (Axelsson et al., 2012).

Une tumeur cancéreuse provoque dans la grande majorité des cas une réaction inflammatoire, les leucocytes y sont donc normalement attirés. Toutefois, l'infiltration des

leucocytes diffère en fonction du type de tumeur étudiée et leur action est perturbée par le microenvironnement des cellules cancéreuses. Par exemple, l'analyse d'explants cliniques montrent souvent la présence d'une grande quantité de neutrophiles dans les tumeurs, mais ces derniers sont souvent associés à une croissance rapide ainsi qu'à un mauvais pronostic de survie (Jensen et al., 2009a). Par conséquent, le rôle des neutrophiles dans la lutte anti-tumorale est encore confus, et il apparaît qu'en fonction du type de cancer et des modèles étudiés, les neutrophiles infiltrés peuvent avoir des effets pro- ou anti-tumoraux (Fridlender et al., 2012a; Galdiero et al., 2013; Piccard et al., 2012).

La plupart des tumeurs sécrètent des chimiokines, telles que CXCL6, CXCL8 et CCL3, capables d'attirer les neutrophiles. Une fois arrivés dans la tumeur, les neutrophiles sont activés et produisent à leur tour des chimiokines, amplifiant ainsi la quantité de leucocytes infiltrés (Ueha et al., 2011). Par contre, ils produisent également des protéases, telles que l'élastase, MMP8 ou MMP9, et des facteurs de croissance comme le VEGF ou l'oncostatine M, qui vont être cette fois favorables à la croissance tumorale. Ainsi, il a été montré chez la Souris que la déplétion en neutrophiles conduit à une diminution drastique de la concentration de certains de ces facteurs au sein de tumeurs pancréatiques. L'inactivation génique de l'élastase ou de MMP9 a été corrélée à une diminution de la croissance tumorale (Coussens et al., 2000; Houghton et al., 2010). Les neutrophiles peuvent également favoriser le processus métastatique, *via* une interaction entre la molécule ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) présente sur les cellules tumorales et l'intégrine Mac-1 exprimée à leur surface, ce qui favoriserait leur entrée dans la circulation sanguine (Huh et al., 2010). Enfin, il a été démontré que les neutrophiles infiltrés peuvent avoir une action immunosuppressive en inhibant l'action des cellules CD8⁺ cytotoxiques, probablement *via* la sécrétion d'arginase-1 qui dégrade l'arginine et limite ainsi l'activation des lymphocytes T (Rotondo et al., 2009). Il a d'ailleurs été montré que la déplétion en neutrophiles est corrélée à une activation accrue des cellules T et donc de la réponse anti-tumorale (Fridlender et al., 2009).

A l'inverse, de nombreuses études ont montré que l'infiltration de neutrophiles peut avoir un effet anti-tumoral dans plusieurs formes de cancers (Fridlender et al., 2012a). Ils peuvent directement éliminer les cellules tumorales, grâce à la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) et d'autres effecteurs de mort cellulaire (Granot et al., 2011). Ainsi, les neutrophiles activés expriment Fas, qui en interagissant avec FasL exprimé par les cellules cancéreuses, peut induire leur apoptose. Ils sont également capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires et donc d'augmenter les fonctions cytotoxiques des cellules T CD8⁺. Les neutrophiles peuvent aussi directement présenter des antigènes tumoraux aux cellules T CD8⁺

ou faciliter leur présentation par les autres CPA. Ainsi, certaines thérapies anti-tumorales utilisent les fonctions des récepteurs FcγR et l'activité cytotoxique des neutrophiles. En effet, ces récepteurs FcγR fixent la partie Fcγ des anticorps thérapeutiques, ce qui permet de déclencher un mécanisme d'ADCC (*Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*) anti-tumoral.

Les MDSC (*Myeloid-derived Suppressor Cells*) sont des cellules myéloïdes immunosuppressives retrouvées en grand nombre dans certaines tumeurs cancéreuses (Piccard et al., 2012). Ces cellules ont deux origines : monocyttaire ou granulocytaire, et une étude récente a suggéré que les MDSC granulocytaires et les neutrophiles infiltrés ne sont que des variants d'un même type cellulaire (Fridlender et al., 2012b; Gregory et al., 2011). Etant donné que ces neutrophiles « suppresseurs » partagent de nombreuses caractéristiques avec les macrophages M2, de nombreux auteurs y font référence comme les neutrophiles N2. Par opposition avec les fonctions immunosuppressives des neutrophiles N2, les neutrophiles à activité pro-inflammatoire ont été dénommés neutrophiles N1 (Fridlender et al., 2009). A l'heure actuelle, les facteurs qui dirigent la balance entre neutrophiles N1 anti-tumoraux et neutrophiles N2 pro-tumoraux ne sont pas connus. L'identification de ces facteurs est indispensable pour comprendre les mécanismes de sélection et espérer pouvoir rediriger les neutrophiles N2 vers un phénotype N1 anti-tumoral.

1.1.2. Les cellules NK

Les cellules NK (*Natural Killer*) sont des cellules lymphoïdes granuleuses, classées dans la famille des ILC-1 (*Innate Lymphoid Cells 1*). Leur fonction principale est de lyser les cellules infectées ou cancéreuses sans stimulation antigénique préalable. Elles se différencient à partir de précurseurs hématopoïétiques sous l'action de l'IL-7 et de l'IL-15 principalement. Elles rejoignent alors la circulation, d'où elles migrent vers les sites inflammatoires en réponse à des signaux chimiotactiques (Sun et al., 2011; Vivier et al., 2011).

Une fois dans les tumeurs, les cellules NK constituent, avec les cellules T CD8⁺, la majeure partie des effecteurs de l'immunité anti-tumorale. Leur déplétion chez la Souris à l'aide d'anticorps dirigés contre le récepteur NK1.1 ou le glycolipide asialo-GM1, conduit en effet à une augmentation du développement tumoral (Kim et al., 2000; Smyth et al., 2002; Wu et al., 2003). De même, les souris déficientes en molécules effectrices clés des cellules NK développent facilement des tumeurs cancéreuses (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001). L'absence de molécules du CMH-I et/ou la surexpression des ligands du récepteur NKG2D (*Natural-Killer Group 2, member D*) sont responsables de la susceptibilité des cellules tumorales vis-à-vis des cellules NK (Diefenbach et al., 2001; Kärre et al., 2005). Dans certains

modèles expérimentaux, l'élimination des cellules cancéreuses par les cellules NK induit le développement d'une réponse T spécifique, formant ainsi un lien entre immunité innée et immunité adaptative (Sun et al., 2009). De plus, l'inhibition des récepteurs KIR (*Killer Inhibitory Receptors*) des cellules NK augmente leur activité anti-tumorale dans des cancers murins (Koh et al., 2001). Toutes ces observations suggèrent que ces cellules participent largement à la lutte anti-tumorale. Les études cliniques vont aussi dans ce sens, puisque l'infiltration des cellules NK, et plus généralement des lymphocytes, est corrélée à de bons pronostics de survie chez les patients (Coca et al., 1997; Ishigami et al., 2000; Villegas et al., 2002). La plupart du temps, les cellules NK ne sont pas retrouvées en grande quantité dans les tumeurs, ce qui suggère qu'elles ont des difficultés à rejoindre les sites tumoraux. Cependant, en dépit de leur nombre réduit, elles ont un rôle majeur dans l'élimination des cellules cancéreuses (Esendagli et al., 2008).

Les cellules NK sont capables de lyser les cellules cancéreuses *via* un mécanisme d'ADCC. Ainsi, elles peuvent reconnaître, *via* l'expression du FcR3a (*Fc Receptors*) (CD16), des anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux et initier une réponse cytotoxique (Campbell et al., 2013). Les cellules NK sont également capables de discriminer les cellules normales des cellules infectées par un virus et des cellules tumorales grâce à un mécanisme intrinsèque. Ainsi, elles utilisent un large répertoire de récepteurs de surface capables de réguler leur activité cytolytique. Mais contrairement aux lymphocytes CD8⁺, elles ne subissent pas de recombinaisons des gènes codant pour ces récepteurs. En effet, leur action est régulée par la balance entre des signaux positifs et négatifs provenant des interactions entre leurs différents récepteurs et des molécules localisées à la surface de leurs cellules cibles (Lanier, 2005; Smyth et al., 2005). Par exemple, les cellules NK sont activées lorsque leurs cellules cibles n'expriment pas de molécules du CMH-I, ce qui est le cas de nombreuses cellules cancéreuses (Smyth et al., 2002, 1999). Toutefois, la diminution de la quantité de CMH-I ne suffit pas à expliquer l'initiation de la cytotoxicité, et plusieurs études suggèrent qu'il faut également d'autres signaux pour que les cellules NK agissent. Parmi ces signaux, celui qui a été le plus étudié provient du récepteur NKG2D. En effet, l'inhibition de ce récepteur conduit à une augmentation de la croissance tumorale, confirmant son rôle important dans la lutte contre les tumeurs (Bauer, 1999; Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001). NKG2D est une lectine de type 2, exprimée par la majorité des cellules NK, qui reconnaît des ligands que l'on retrouve en abondance sur de nombreuses cellules cancéreuses (Friese et al., 2003; Salih, 2003; Vetter et al., 2002; Watson et al., 2006). Ce sont essentiellement les protéines de la famille ULBP (*UL16-binding proteins*), ainsi que les protéines MICA et MICB (*MHC class I-chain-related proteins*)

(Raulet, 2003). Les cellules non-cancéreuses peuvent dans certains cas exprimer les mêmes ligands, mais elles sont protégées de l'activité cytotoxique des cellules NK par les molécules du CMH-I, qui en se liant aux récepteurs KIR inhibent la signalisation de NKG2D. Par son activité lectinique, ce récepteur est également capable d'interagir avec les HS. Ces derniers, dont la structure est modifiée dans les cellules cancéreuses, pourraient donc participer à la modulation de la cytotoxicité des cellules NK (Higai et al., 2011).

De nombreux autres récepteurs des cellules NK ont été identifiés, mais ils ont fait l'objet de moins d'études. Par exemple, les trois récepteurs NKp46, NKp44 et NKp30 (*Natural killer cell p30-related protein*), aussi appelés NCR (*Natural Cytotoxic Receptors*), participent aussi à l'élimination des cellules cancéreuses (Arnon, 2004; Costello, 2002; Fauriat et al., 2007; Moretta et al., 2001). Une fois engagés avec leurs ligands respectifs, ces récepteurs activent de nombreuses voies de signalisation conduisant à la réponse cytotoxique et à la sécrétion de cytokines. Toutefois, les ligands de ces récepteurs ne sont pas clairement identifiés. Par exemple, des études ont suggéré que NKp30 pourrait reconnaître la molécule B7-H6, largement exprimée par les cellules tumorales (Kaifu et al., 2011). De plus, NKp30 pourrait lier la molécule Bat3 (*B associated transcript 3*), dont la localisation principale est nucléaire mais qui pourrait être externalisé dans certains types de cancers (Simhadri et al., 2008). En ce qui concerne NKp44 et NKp46, il a été suggéré que leurs ligands pourraient être des GAGs et plus particulièrement des HS (Brusilovsky et al., 2014). En effet, il a été montré que NKp46, mais également NKp30, reconnaissent des HS fortement sulfatés riches en groupements 2-*O*- et *N*-sulfatés. NKp44, quant à lui, n'aurait pas la même exigence quant à la présence de groupements 2-*O*-sulfatés (Hecht et al., 2009).

La sulfatation des GAGs est modifiée, voire même augmentée, dans de nombreux types de cancers. Les HS exprimés par les cellules cancéreuses pourraient donc être reconnus par les cellules NK et ainsi activer leur activité cytotoxique. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que les cellules tumorales surexprimant l'héparanase, les cellules CHO dépourvues de HS ou encore des cellules cancéreuses pancréatiques déficientes en glypican-1, sont moins reconnus par les récepteurs NKp30 et NKp46, et par conséquent moins sensibles à l'action des cellules NK (Bloushtain et al., 2004). Ainsi, les HS des cellules cancéreuses pourraient directement initier la cytotoxicité des cellules NK. Plus récemment, un autre mécanisme d'action a été proposé pour le rôle des GAGs. En effet, les HS des cellules NK pourraient agir comme des régulateurs allostériques des récepteurs NK et moduler leur capacité à interagir avec d'autres ligands présents sur les cellules cibles (Brusilovsky et al., 2013).

1.1.3. Les cellules NKT

Les cellules NKT sont des cellules lymphoïdes qui partagent des caractéristiques communes avec les lymphocytes T classiques, puisqu'elles expriment les récepteurs TCR $\alpha\beta$ (*T-Cell Receptor $\alpha\beta$*) et le CD3, et avec les cellules NK, par l'expression du récepteur NK1.1 et leur capacité à éliminer les cellules par un mécanisme de type NK (Kronenberg, 2005). Par contre, la différence avec les deux types cellulaires précédents est leur capacité d'interaction avec le CD1d, une molécule du CMH non classique. Elles sont ainsi impliquées dans la reconnaissance privilégiée de structures lipidiques plutôt que de fragments protéiques. Le sous-type majeur de cellules NKT est caractérisé par la présence d'un TCR relativement invariant avec une chaîne V α 24J α 18 et seulement quelques chaînes β possibles. Cela explique leur capacité à ne reconnaître qu'un seul antigène (α -galactosylcéramide (α -GalCer)) présenté par le CD1d. Ce sous-type a reçu plusieurs dénominations, NKT classiques, NKT de type I ou encore iNKT pour NKT invariantes. En plus des cellules iNKT, un autre sous-type de cellules NKT, dénommées NKT de type II ou NKT variantes (vNKT), a été mis en évidence. Contrairement aux iNKT, ces cellules possèdent un TCR variant et ne répondent pas à l' α -GalCer. Par contre, elles répondent à d'autres types de lipides présentés par le CD1d. Bien que plusieurs études se soient intéressées aux deux sous-types de NKT, peu de choses sont connues sur leurs fonctions respectives (Berzofsky et al., 2009; Vivier et al., 2012).

Les cellules NKT forment un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. En effet, en plus de reconnaître des antigènes et donc d'appartenir à l'immunité adaptative, elles sont parmi les premières recrutées sur les sites inflammatoires et ont donc un rôle dans l'immunité innée. Le rôle des cellules NKT dans l'immunité anti-tumorale a été mis en évidence par la démonstration que l'injection d' α -GalCer dans des souris les protégeaient de différentes formes de cancers (Berzofsky et al., 2009; Morita et al., 1995). Par la suite, il a clairement été montré que les cellules NKT ont un effet protecteur contre les cellules cancéreuses (Smyth et al., 2000a). L'effet anti-tumoral est essentiellement lié à la production d'IFN γ et à l'activation des cellules NK, et plusieurs modes d'action ont été proposés. Les cellules iNKT peuvent reconnaître les cellules tumorales qui expriment le CD1d, et les éliminer directement ou par l'intermédiaire des cellules NK. Cependant, toutes les tumeurs n'expriment pas le CD1d : dans ce cas, les NKT seraient activées de façon indirecte par le CD1d présenté par les CPA, ce qui leur permettrait d'activer les cellules NK (Vivier et al., 2012).

Parallèlement à cette activité anti-tumorale, quelques travaux ont attribué un rôle suppresseur aux cellules NKT dans certains modèles expérimentaux. Par exemple, des souris déficientes en CD1d, qui ne présentent donc aucun des deux sous-types de cellules NKT, se

sont révélées plus sensibles à la progression tumorale. Dans ces modèles, l'effet suppresseur serait essentiellement dû à la production d'IL-13 et de TGF- β , deux cytokines ayant un rôle anti-inflammatoire sur de nombreuses cellules immunes (Park et al., 2005; Terabe et al., 2004, 2000). Ces observations sont donc paradoxales puisque qu'elles suggèrent que les cellules NKT peuvent avoir des fonctions pro- ou anti-tumorales. Comme pour d'autres cellules immunitaires, cela pourrait être dû à l'environnement cytokinique des tumeurs. Toutefois, il a été suggéré que les NKT de type I ont plutôt un rôle anti-tumoral alors que les NKT de type II favorisent la progression cancéreuse. En effet, l'utilisation d'activateurs spécifiques des NKT de type I (α -GalCer) ou de type II (sulfatides) ont des effets opposés sur les tumeurs, puisque l' α -GalCer inhibe la croissance des cellules cancéreuses alors que les sulfatides augmentent leur progression (Ambrosino et al., 2007).

1.1.4. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Comme les cellules NKT, les lymphocytes $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T non conventionnels appartenant à la fois aux systèmes immunitaires inné et adaptatif, et capables de faire le lien entre les deux (Catros et al., 2010). En effet, les cellules T $\gamma\delta$ produisent des cytokines lorsqu'un pathogène entre dans l'organisme et sont aussi capables de lyser des cellules exprimant des antigènes spécifiques. Elles représentent 1 à 10 % des lymphocytes circulants mais la proportion peut atteindre 50% au niveau de certaines muqueuses (Hayday, 2000; Mak et al., 1998). Contrairement aux cellules T conventionnelles, les lymphocytes T $\gamma\delta$ n'ont pas forcément besoin des CMH pour reconnaître les antigènes, et ils n'expriment que très rarement les co-récepteurs CD4⁺ et CD8⁺, dont le rôle est de renforcer l'interaction avec les molécules du CMH. De plus, la variabilité du TCR $\gamma\delta$ est moins importante que celle du TCR $\alpha\beta$, bien que l'organisation des loci soit similaire. Ainsi, l'hétérodimère $\gamma\delta$ provenant d'une expression combinatoire restreinte confère aux TCR $\gamma\delta$ un répertoire limité. Chaque réarrangement constitue donc une sous-population particulière par son récepteur mais aussi par sa localisation tissulaire. Chez l'Homme, les cellules T $\gamma\delta$ présentent des associations privilégiées comme V γ 9 avec V δ 2 (T V γ 9V δ 2) ou V γ 2-8 avec V δ 1 (dites non- δ 2). Les cellules T V γ 9V δ 2 sont majoritaires chez l'adulte et sont principalement retrouvées dans le sang périphérique. Elles reconnaissent des phosphoantigènes, alors que les cellules V δ 1 sont plus fréquentes dans l'intestin et reconnaissent des antigènes de stress (MICA et MICB) (Catros et al., 2010).

Plusieurs chimiokines sécrétées par les tumeurs ou leur environnement sont capables de recruter les lymphocytes T $\gamma\delta$. Cependant, les cellules T V δ 1 et V γ 9 δ 2 ne présentent pas les

mêmes récepteurs à chimiokines, puisque les premières expriment uniquement CCR5 alors que les secondes possèdent les récepteurs CCR5 et CXCR3. De plus, les cellules T V δ 1 utilisent un large panel de molécules d'adhérence, LFA-1, VLA- α 4, VLA- α 5, L-sélectine et α E β 7, pour se lier à l'endothélium alors que les cellules T V γ 9 δ 2 n'utilisent que LFA-1, la L-sélectine et le récepteur CD44v6. Toutes ces différences suggèrent que les deux sous-types utilisent des mécanismes indépendants pour rejoindre les sites tumoraux, et qu'elles pourraient donc avoir des fonctions différentes dans l'immunité anti-tumorale (Kabelitz et al., 2003; Thomas et al., 2001).

Dans les tumeurs, le rôle des cellules T V δ 1 n'est pas clairement élucidé. En revanche, de nombreuses études ont été réalisées sur l'action des cellules T V γ 9 δ 2. Leurs capacités à produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et à reconnaître des antigènes indépendamment des molécules du CMH, associées à leurs fonctions cytotoxiques, font de ces cellules des acteurs majeurs de l'immunité anti-tumorale. Il a d'ailleurs été montré qu'elles sont capables de lyser de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses *in vitro* (Chargui et al., 2010; D'Asaro et al., 2010; Gertner-Dardenne et al., 2009; Todaro et al., 2009). Les cellules T V γ 9 δ 2 reconnaissent des phosphoantigènes qui sont des métabolites phosphorylés issus de la biosynthèse des isoprénoides chez les bactéries et de la voie du mévalonate dans les cellules humaines. L'accumulation de métabolites du mévalonate dans les cellules tumorales est un puissant signal de danger activateur des cellules T γ δ . En effet, dans les cellules normales, ces métabolites ne sont pas synthétisés en quantité suffisante pour induire une réponse. Par contre, dans certains types de cancers, cette voie est dérégulée, ce qui conduit à une forte production de métabolites (Gober et al., 2003; Uchida et al., 2007). De plus, il a été reporté que la capacité des cellules T γ δ à reconnaître et éliminer les cellules tumorales peut être augmentée après traitement avec des biphosphonates, comme le zoledronate. (Lai et al., 2012; Todaro et al., 2009). En plus des phosphoantigènes, les cellules T γ δ peuvent aussi être activées par l'ATPase F1 en complexe avec l'apolipoprotéine A-I, exprimée à la surface de certaines tumeurs (Scotet et al., 2005). L'ATPase F1 est un complexe protéique intracellulaire impliqué dans la production d'ATP, mais elle possède des caractéristiques similaires aux protéines impliquées dans la présentation des antigènes. Elle pourrait ainsi lier certains métabolites du mévalonate et les présenter aux cellules T γ δ (Mookerjee-Basu et al., 2010).

En plus de leur activité anti-tumorale dépendante du TCR, les cellules T γ δ expriment des récepteurs présents sur les cellules NK et impliqués dans la cytolyse des cellules tumorales. Le récepteur NKG2D, par exemple, est exprimé par les cellules T V γ 9 δ 2, et peut induire la production de TNF- α et du récepteur à l'IL-2 (Rincon-Orozco et al., 2005). A l'instar d'autres

types de leucocytes, les cellules T $\gamma\delta$ expriment aussi le FcRIII (CD16), qui leur permet d'initier le mécanisme d'ADCC (Z. Chen et al., 2008; Gogoi et al., 2013).

1.1.5. Les MDSC

Les MDSC (*Myeloid Derived Suppressor Cells*) sont des cellules hématopoïétiques immatures, provenant de progéniteurs myéloïdes ou de cellules myéloïdes immatures. Elles forment donc une population hétérogène, présentant un aspect morphologique proche des monocytes ou des neutrophiles, mais n'exprimant pas les marqueurs membranaires spécifiques des cellules matures (Serafini et al., 2006). Elles sont définies comme des cellules CD11b⁺, CD14⁻, expriment le marqueur myéloïde CD33 mais ne présentent aucun marqueur de cellules matures. En condition physiologique normale, elles sont présentes en très faible quantité dans l'organisme, car elles se différencient rapidement en granulocytes, macrophages ou cellules dendritiques. En revanche, leur proportion augmente en cas d'infection ou de cancer, car un blocage de la différenciation myéloïde conduit à leur expansion. Dans ces contextes pathologiques, les MDSC surexpriment des facteurs impliqués dans des fonctions immunosuppressives, comme le gène de l'arginase-1 ou l'IL-10. Contrairement aux autres leucocytes, elles n'ont aucune activité anti-tumorale. Par contre, leur action immunosuppressive favorise la progression des tumeurs (Bruchard et al., 2014; Ochoa et al., 2007; Youn et al., 2008).

L'accumulation des MDSC est contrôlée par de nombreux facteurs, qui peuvent être directement sécrétés par les cellules tumorales ou par leur environnement. Les premiers jouent en général un rôle prépondérant dans l'expansion des MDSC en stimulant la myélopoïèse et en inhibant la différenciation myéloïde. Les autres facteurs sécrétés par l'environnement tumoral vont ensuite conduire à l'activation des MDSC. Ainsi, les tumeurs sécrètent de nombreux facteurs solubles qui recrutent les MDSC immatures de la moelle osseuse vers la rate et les organes lymphoïdes. Les facteurs solubles vont ensuite contrôler la maturation des MDSC et leur migration vers le microenvironnement tumoral. Une fois dans la tumeur, les cellules seront activées et pourront exercer leur activité suppressive sur la réponse immunitaire anti-tumorale (Khaled et al., 2013; Ostrand-Rosenberg et al., 2009). Parmi les facteurs impliqués dans le recrutement des MDSC, on retrouve des prostaglandines, principalement la PGE₂ (Prostaglandine E₂), des ligands des TLRs, le SCF (*stem cell factor*), l'IL-6, l'IL-1 β et certaines chimiokines (CCL2, CXCL5 et SDF-1) (Bunt et al., 2007; Delano et al., 2007; Dolcetti et al., 2008; Gabrilovich et al., 1998; Pan et al., 2008; Serafini et al., 2004). La PGE₂ est par exemple à l'origine de l'expansion des MDSC chez des patients atteints de cancer du rein (Ochoa et al.,

2007). Son action passe par l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'expression de molécules anti-inflammatoires comme l'arginase-1 (Rodriguez et al., 2005). Des souris déficientes dans l'expression du récepteur de l'IL-1 β ont un nombre réduit de MDSC et une croissance tumorale retardée, confirmant le rôle de cette cytokine (Bunt et al., 2007; Song et al., 2005). Certains agonistes des TLRs participent également à l'expansion des MDSC, en synergie avec la voie de l'IL-1 β . En effet, on observe une abolition complète de l'expansion des MDSC dans des souris déficientes en TLR4 ou en MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene (88)*) (Bunt et al., 2009; Delano et al., 2007). Un certain nombre de facteurs, tels que l'IL-4, l'IL-13 et le TGF- β , ont été décrits comme activateurs des MDSC. Ainsi, l'activation de STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*), qui est induite par la fixation de l'IL-4 ou l'IL-13, est nécessaire à l'expression de l'arginase-1 et du TGF- β , une cytokine ayant un fort pouvoir immunosuppresseur (Bronte et al., 2003; Movahedi et al., 2008; Terabe et al., 2003).

L'action immunosuppressive des MDSC requiert le plus souvent une proximité cellulaire, indiquant que les signaux passent essentiellement par des contacts membranaires et/ou par la libération de facteurs solubles à courte demi-vie. Plusieurs mécanismes expliquant l'action immunosuppressive des MDSC ont été identifiés. Les MDSC sont par exemple capables d'inhiber la production d'IL-2 par les lymphocytes infiltrés dans les tumeurs et ainsi d'inhiber leur prolifération. Cette action suppressive sur les cellules T nécessite un contact intercellulaire (Nagaraj et al., 2007; Sinha et al., 2005). Il a ainsi été montré que l'inhibition de l'interaction entre les lymphocytes T et les MDSC par un anticorps bloquant anti-CMH-I empêche l'action suppressive des MDSC (Gabrilovich et al., 2001). Il n'est en revanche pas certain que ce phénomène s'applique aux cellules T CD4⁺, car seule une très faible proportion de MDSC exprime le CMH-II. Cette observation pourrait expliquer pourquoi les lymphocytes T de patients atteints de cancer restent activables par des stimuli antigéniques autres que ceux de la tumeur. Les MDSC sont également capables, *via* l'expression membranaire du CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) (Yang et al., 2006) et/ou la production d'IL-10 et de TGF- β (Huang et al., 2006), d'induire l'activation des lymphocytes T suppresseurs (Treg). La production d'IL-10 combinée à l'inhibition de la synthèse d'IL-12 peut également favoriser dans certaines tumeurs une polarisation immune de type 2. Un dialogue peut alors se mettre en place entre les MDSC et les macrophages, qui à leur tour vont se différencier et produire de l'IL-10 (Sinha et al., 2007). Finalement, il a été suggéré que les MDSC agissent également sur les cellules NK, par inhibition du récepteur NKG2D des cellules NK (Li et al., 2009). Toutefois, cette activité est controversée, car les MDSC expriment Rac-1, un ligand activateur de NKG2D.

Les MDSC pourraient donc en théorie activer les cellules NK, ce qui reflète encore une fois l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules immunes associées aux tumeurs (Nausch et al., 2008).

1.1.6. Les macrophages

Dans les tumeurs, la majorité des macrophages infiltrés proviennent de la différenciation des monocytes circulants du sang. Ils sont caractérisés par l'expression de marqueurs spécifiques tels que CD16, CD68, CD115, CD163 et CD312, ainsi que par leur capacité de phagocytose, ce qui les différencie des autres cellules myéloïdes (Geissmann et al., 2010). La plasticité du phénotype des macrophages leur permet de s'adapter à de nombreux signaux environnementaux, ce qui fait d'eux des acteurs majeurs de l'immunité innée. Ainsi, en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, ils subissent une polarisation dite classique, nommée M1, et sont alors capables d'activer les cellules de l'immunité adaptative, de produire de grandes quantités d'IL-12 et d'exprimer les récepteurs CMH-II. Ils ont également une activité microbicide et tumoricide élevée et sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Lewis et al., 2006). En revanche, en présence de stimuli de type Th2 comme l'IL-4 ou l'IL-13, les macrophages vont subir une activation alternative ou M2. Ces cellules n'ont qu'une faible capacité de présentation des antigènes et produisent de fortes quantités de cytokines immunosuppressives. Ils produisent également de l'arginase, permettant la production d'ornithine indispensable aux processus de cicatrisation. Par conséquent, les macrophages M2 participent aux processus de réparation tissulaire et de résolution de l'inflammation (Martinez et al., 2008). Cependant, cette classification représente une vue simplifiée de la réalité physiologique puisqu'il est maintenant établi qu'il existe un spectre continu de phénotypes intermédiaires entre l'activation M1 et M2, pouvant avoir des fonctions différentes. Il n'existe donc pas deux types de macrophages, mais une multitude d'états intermédiaires en fonction des stimuli présents dans l'environnement tissulaire, les types M1 et M2 représentant les extrêmes de ces phénotypes (Martinez et al., 2014).

Les macrophages représentent la majorité des leucocytes infiltrés dans de nombreux types de tumeurs. Les chimiokines CCL2, CCL5, CXCL12 et CXCL1 sont largement exprimées dans les tissus néoplasiques et sont donc responsables en grande partie du recrutement des monocytes du sang sur les sites tumoraux (Mantovani et al., 2004). Les facteurs de croissance et les peptides chimiotactiques, comme le VEGF, le TGF- β , le FGF-2, le M-CSF, l'uPa et la β -defensine-3 sont également impliqués dans le recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages au sein des tumeurs cancéreuses (Allavena et al., 2012). Une fois sur le site tumoral, les monocytes/macrophages vont entrer en contact avec des stimuli

variés qui dicteront leur phénotype. Ainsi, lors des étapes d'initiation de la tumorigenèse, les macrophages ont plutôt un phénotype M1 et participent à la création d'un environnement inflammatoire propice à la croissance cellulaire. Par contre, les phases plus tardives de la tumorigenèse vont favoriser un phénotype M2 (Qian et al., 2010).

Les facteurs impliqués dans la polarisation des macrophages sont nombreux. Ils sont synthétisés en partie par les cellules cancéreuses mais d'autres types cellulaires, comme les leucocytes infiltrés et les cellules du stroma en produisent également. Ainsi, les cellules cancéreuses sont capables de produire de l'IL-10, une cytokine à fort pouvoir immunosuppresseur, puisqu'elle inhibe la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et réduit l'expression du CMH-II (Gastl et al., 1993; Kim et al., 1995). De concert avec l'IL-4, l'IL-10 est également impliqué dans l'induction de la production d'arginase-1 par les macrophages (Lang et al., 2002). Les cellules cancéreuses sont aussi à l'origine de la production de PGE₂, qui peut agir sur les macrophages *via* le récepteur EP4 (*Prostaglandin E Receptor 4*) (Moore et al., 2001). La PGE₂ est un facteur connu de l'activation alternative des macrophages et participe donc à leur polarisation au sein des tumeurs. Enfin, les cellules cancéreuses synthétisent la chimiokine CCL2 et le M-CSF, capables tous deux de recruter les macrophages sur le site tumoral et de favoriser la polarisation M2 (Ruffell et al., 2012). Les cytokines IL-4 et IL-13 sont également retrouvées en grande quantité dans les tumeurs cancéreuses. Leur origine n'est pas encore claire, mais plusieurs travaux ont suggéré qu'elles proviennent, du moins en partie, des lymphocytes T CD4⁺ et des cellules NKT infiltrés (Andreu et al., 2010; DeNardo et al., 2009; Gocheva et al., 2010; Pedroza-Gonzalez et al., 2011; Terabe et al., 2003). En effet, il a été montré dans un modèle de carcinome mammaire chez la Souris que l'IL-4 produite par les lymphocytes T CD4⁺ est nécessaire à la polarisation des macrophages et à la mise en place de leurs fonctions pro-tumorales et pro-métastatiques (DeNardo et al., 2009). De même, la stimulation des macrophages par l'IL-4 augmente la production de facteurs de croissance et de protéases, largement impliqués dans la croissance tumorale, l'angiogenèse et la formation des métastases (Gocheva et al., 2010). Ainsi, l'IL-4 est largement impliquée dans l'activation alternative des macrophages au sein des tumeurs, mais d'autres stimuli peuvent également participer à la mise en place de ce phénotype. Par exemple, l'hypoxie observée au sein de tumeurs solides peut induire l'activation des macrophages qui va conduire à l'expression de molécules pro-angiogéniques et favoriser la croissance tumorale (J. S. Lewis et al., 2000; Movahedi et al., 2010; Ruffell et al., 2012). De même, les signaux de danger libérés dans le milieu de la tumeur, comme l'ATP extracellulaire, peuvent influencer la

polarisation des macrophages vers des fonctions pro-tumorales (Apetoh et al., 2007; Kim et al., 2009).

Dans la plupart des tumeurs, la présence de macrophages est liée à un mauvais pronostic de survie chez les patients (Zhang et al., 2012). En effet, ces macrophages associés aux tumeurs, ou TAM (*Tumor-Associated Macrophages*), agissent sur plusieurs processus favorables à la croissance tumorale (Ruffell et al., 2012). Tout d'abord, ils régulent l'angiogenèse, principalement *via* la production de VEGF-A. En effet, l'effet bénéfique de la déplétion en macrophages peut être inversé par une surexpression de VEGF-A dans les tumeurs (Lin et al., 2007a). Les macrophages produisent également des protéases, comme MMP-9, qui augmentent la biodisponibilité du VEGF-A et potentialisent ainsi son action (Du et al., 2008). D'autres facteurs angiogéniques, comme le PGF (*Placental Growth Factor*) et le FGF-2, sont également sécrétés par les TAM et capables d'induire la formation de capillaires (Motz et al., 2011). La production de facteurs de croissance, tels que l'EGF ou le FGF-2, va directement agir sur la prolifération des cellules tumorales (Condeelis et al., 2006). Ces facteurs sont également capables de promouvoir l'invasion des cellules malignes dans les tissus sains et donc de favoriser les métastases. Plusieurs études ont en effet démontré que l'inhibition des voies activées par ces facteurs de croissance conduit à une réduction de la croissance tumorale ainsi qu'à une diminution du taux de métastases (Ruffell et al., 2012). Les TAM régulent également l'environnement tumoral, *via* la sécrétion de composants de la matrice extracellulaire, tels que les collagènes et la fibronectine, et la production d'un large panel de protéases matricielles, dont de nombreuses MMPs et cathepsines (Mason et al., 2011). Ce remodelage de la matrice extracellulaire serait un facteur aggravant, car il favorise la migration des cellules cancéreuses et la formation de métastases. Il a en effet été démontré que l'inactivation des cathepsines B et S dans un modèle murin s'accompagne d'une réduction du taux de métastases (Almholt et al., 2005; Sameni et al., 2009).

Finalement, les TAM participent à la tolérance immunitaire retrouvée dans les tumeurs cancéreuses. En effet, la suppression des réponses T cytotoxiques est observée dans la majorité des tumeurs solides. D'autres types cellulaires, tels que les MDSC, les neutrophiles N2 ou les lymphocytes Treg, sont susceptibles d'induire cette immunosuppression, mais les études récentes suggèrent que les macrophages sont les principaux médiateurs de cette tolérance. Ainsi, les TAM sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T *in vitro* (Movahedi et al., 2010; Ojalvo et al., 2009), et sécrètent des chimiokines, comme CCL22, impliquées dans le recrutement spécifique des lymphocytes Treg sur le site tumoral (Curiel et al., 2004). Comme pour d'autres types cellulaires suppresseurs, ils sont capables de produire l'arginase-1, ce qui,

via la production de ROS, inhibe l'activation des cellules cytotoxiques (Galdiero et al., 2013). Les TAM expriment aussi les co-récepteurs de la famille B7, qui sont capables de moduler négativement l'activation des lymphocytes T (Kryczek, 2006).

La polarisation des macrophages est donc un paramètre important pour l'expansion tumorale. Dans la majorité des cas, l'environnement tumoral conduit à une activation alternative et par conséquent à un phénotype pro-tumoral. Toutefois, il a été démontré que la « reprogrammation » du phénotype des TAM pouvait inhiber leur activité pro-tumorale, et voire dans certaines cas, induire une activité tumoricide (Ahn et al., 2010; Stout et al., 2009). Par conséquent, l'inhibition du recrutement des macrophages, leur élimination ou encore leur reconversion vers un phénotype M1 sont des pistes à fort potentiel thérapeutique (Beatty et al., 2011; Edwards et al., 2010; Germano et al., 2013; Rozel et al., 2009; Xin et al., 2009).

1.1.7. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des CPA professionnelles et jouent donc un rôle majeur dans l'initiation et la régulation de la réponse immune adaptative (Strioga et al., 2013). Elles sont caractérisées par l'expression élevée de CMH-I et CMH-II, ainsi que des molécules de co-stimulation nécessaires à la présentation des antigènes par les CMH, telles que CD80 et CD86. En revanche, elles n'expriment pas, sauf cas particuliers, les récepteurs CD3, CD19, CD20, CD14, CD16 et CD56 (Saththaporn et al., 2001). Il existe plusieurs sous-types de cellules dendritiques, généralement regroupés en deux catégories, les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Masten et al., 2006). Les premières, encore appelées cellules dendritiques conventionnelles ou classiques, proviennent de précurseurs hématopoïétiques et sont caractérisées par leur expression du CD11c. Elles rejoignent la circulation sanguine sous forme de précurseurs (pré-DC), puis elles migrent dans les tissus où elles se différencient en cellules dendritiques immatures. Après avoir rencontré un antigène et capté des signaux de danger, les mDC sont activées et migrent vers les ganglions lymphatiques où elles pourront présenter les antigènes aux cellules T et ainsi initier la réponse immune adaptative (Liu et al., 2009). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dérivent également de la moelle osseuse, de progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes, bien que leur origine myéloïde prédomine. Elles sont caractérisées par leur morphologie sphérique, l'absence d'expression de CD11c et l'expression de marqueurs de surface spécifiques comme le CD85g (ILT7) ou le CD303 (BDCA-2) (Cao, 2009). Les pDC résident principalement dans les organes lymphoïdes et le sang, et sont les principales cellules productrices d'IFN- α et d'IFN- β en réponse à des acides nucléiques viraux ou bactériens. Ces signaux sont captés par les récepteurs

TLR7 et TLR9 largement exprimés par les pDC (Reizis et al., 2011). Bien qu'elles puissent subir le même type de maturation que les mDC et ainsi présenter des antigènes aux cellules T, l'efficacité de présentation d'antigènes par les pDC est plus faible. De plus, elles seraient spécialisées dans la présentation d'antigènes particuliers, notamment viraux, plutôt que dans la présentation de tous types d'antigènes comme les mDC. Il faut aussi noter que certaines cellules dendritiques retrouvées dans les tissus peuvent dériver de la différenciation des monocytes du sang (Strioga et al., 2013). Enfin, en plus de leurs fonctions de cellules présentatrices d'antigènes, les cellules dendritiques (mDC et pDC) peuvent exercer des activités cytotoxiques sous certaines conditions (Chan et al., 2008).

Il est aujourd'hui bien établi que l'instabilité génétique et le fort taux de mutations dans les cellules cancéreuses conduisent à l'apparition d'antigènes tumoraux qui peuvent être reconnus par les cellules dendritiques. Par exemple, certaines formes de glycosylations aberrantes retrouvées sur les cellules cancéreuses peuvent induire la maturation des cellules dendritiques (Segal et al., 2008; van Gisbergen, 2005). Toutefois, les antigènes tumoraux sont en général présents en faible quantité et leur reconnaissance est relativement difficile (Schreiber et al., 2010). Par contre, l'hypoxie et le manque de nutriments au sein de la tumeur produits des corps apoptotiques ou nécrotiques, qui seront plus facilement reconnus par les cellules dendritiques (Petersen et al., 2010). Alors que la reconnaissance des cellules nécrotiques induit l'activation de la réponse adaptative, il a été démontré que les cellules apoptotiques conduisaient plutôt à une tolérance immunitaire. En effet, les cellules nécrotiques relâchent de nombreux signaux de dangers qui sont capables d'initier la maturation des DC. En revanche, l'absorption de cellules apoptotiques, qui est un processus physiologique normale, conduit à l'inactivation des cellules dendritiques et à la production de cytokines immunosuppressives (Kono et al., 2008). La proportion de cellules nécrotiques et apoptotiques varie en fonction du type de tumeurs, ce qui affecte les réponses anti-tumorales médiées par les cellules dendritiques (Strioga et al., 2013).

Outre leurs capacités à présenter les antigènes tumoraux, les cellules dendritiques sont capables d'agir directement sur les cellules cancéreuses. En effet, les mDC peuvent lyser certains types de cellules tumorales *via* un mécanisme dépendant de TRAIL (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*), une cytokine pro-apoptotique (Fanger et al., 1999). Elle peuvent également agir en sécrétant le granzyme B et la perforine en réponse à des ligands de TLR7 et TLR8 (Stary et al., 2007). Cependant, cette activité cytotoxique peut être délétère dans certains cas, puisque les mDC peuvent aussi lyser des lymphocytes T par des mécanismes dépendants des FasL et PD-L2 (*Programmed Death-Ligand 2*) (Zhao et al., 2013). Les pDC

possèdent les mêmes propriétés cytotoxiques, mais leur activité anti-tumorale est surtout liée à la forte production d'IFN- α , qui peut agir directement sur les cellules tumorales et limiter leur prolifération (Aricò et al., 2012). De plus, cette cytokine agit sur d'autres cellules immunes. Ainsi, elle participe à la différenciation des monocytes en cellules dendritiques et prolonge la survie des mDC, ce qui augmente leur capacité à présenter les antigènes (Diamond et al., 2011).

Les deux sous-types de cellules dendritiques sont donc susceptibles de lutter activement contre les tumeurs. Toutefois, il a été démontré que leurs fonctions sont souvent altérées au sein des tumeurs. Par exemple, elles peuvent rester sous forme immatures, voire même exprimer des molécules immunosuppressives. Elles ont alors une faible capacité de présentation des antigènes et vont inhiber la réponse lymphocytaire T. En outre, les pDC produisent moins d'IFN- α , en raison d'une expression réduite de TLR9. Dans ces conditions, les cellules dendritiques infiltrées induisent une tolérance immunitaire vis-à-vis des antigènes tumoraux plutôt que d'initier la réponse anti-tumorale attendue (Bennaceur et al., 2009).

En plus de l'absence de signaux inducteurs de l'activation et de la maturation des cellules dendritiques, certains facteurs dérivés des tumeurs peuvent directement favoriser la tolérance. Par exemples, des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et le TGF- β , des enzymes telles que l'indoleamine 2,3-dioxygénase et l'arginase, des facteurs de croissance comme le GM-CSF et le VEGF, ainsi que d'autres facteurs solubles, comme le PGE₂, vont exercer des activités suppressives sur les cellules dendritiques. Ces facteurs peuvent être sécrétés par les cellules cancéreuses, mais surtout par les autres leucocytes infiltrés, notamment les MDSC et les TAM (Apetoh et al., 2011; Solinas et al., 2009). Par conséquent, il est possible de restaurer les fonctions immunogéniques des cellules dendritiques en enlevant la tumeur, mais également en isolant des cellules dendritiques et en les rééduquant *ex vivo* en absence des facteurs dérivés des tumeurs (Bennaceur et al., 2009). En effet, l'élimination de la tumeur n'est pas toujours associée à la restauration des fonctions des cellules dendritiques, ce qui peut s'expliquer par le fait que les tissus adjacents continuent à sécréter des facteurs immunosuppresseurs.

Finalement, une dernière fonction pro-tumorale attribuée aux cellules dendritiques vient de leur potentiel angiogénique. En effet, les formes immatures produisent de grandes quantités de VEGF-A et de FGF-2. Les tumeurs tirent profit de cette propriété en recrutant des cellules dendritiques immatures et en inhibant leur maturation (Fainaru et al., 2010; Sprague et al., 2011).

1.2. Les cellules du système immunitaire adaptatif

L'immunité adaptative repose sur un mécanisme de défense basé sur la reconnaissance d'antigènes et sur la mémoire immunitaire. Cette immunité doit être capable de reconnaître les molécules étrangères ou altérées et de les discriminer des antigènes du soi, au risque de voir la réponse dévier vers une pathologie auto-immune. La réponse immunitaire adaptative est mise en œuvre par les lymphocytes B et T (CD3⁺), ces derniers étant classés en sous-populations distinctes : les lymphocytes T auxiliaires ou « helper » (Th) (CD4⁺), les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8⁺, et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Les autres types lymphocytaires (NKT, T $\gamma\delta$) se situent à l'interface entre les systèmes inné et adaptatif (Alberts, 2002).

Dans les cancers, la réponse adaptative est majoritairement médiée par les lymphocytes T. Ainsi, les lymphocytes spécifiques d'un antigène tumoral prolifèrent et se différencient ensuite en cellules effectrices capables de cibler les cellules tumorales, ou en cellules mémoires capables de prévenir l'apparition de métastases. Les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ reconnaissent spécifiquement les antigènes tumoraux présentés par les molécules du CMH-I ou du CMH-II. Le premier antigène tumoral identifié a été caractérisé à partir de cellules de mélanomes humaines et dénommé MAGE (*Melanoma Antigen*). Depuis sa découverte, de nombreux autres antigènes ont été identifiés comme étant capables d'induire une réponse anti-tumorale spécifique (van der Bruggen et al., 1991).

Les antigènes tumoraux ont été classés en plusieurs catégories. La première comprend les antigènes onco-fœtaux, qui résultent de la réactivation de gènes embryonnaires dans les cellules cancéreuses (De Smet et al., 1999). L'antigène MAGE fait parti de cette famille, et on considère que 60 à 70% des mélanomes malins expriment au moins un antigène onco-foetal (Chen et al., 1997). La deuxième catégorie comprend des molécules présentes dans les cellules normales à des taux faibles, mais dont l'expression va être fortement augmentée dans les cancers. Un exemple de ce type d'antigènes est la télomérase, qui est peu exprimée ou absente dans les tissus normaux, mais qui se retrouve surexprimée dans 85% des cancers (Vonderheide et al., 1999). La troisième classe regroupe des protéines dont la structure est modifiée suite à des mutations géniques. Par exemple, les altérations au niveau des proto-oncogènes Ras, B-Raf ou p53 produisent des protéines mutées, dont certains peptides seront capables d'induire des réponses lymphocytaires T (Gjertsen et al., 1997). Finalement, les molécules spécifiquement exprimées par les cellules malignes constituent la dernière classe d'antigènes tumoraux (Yee et al., 2000).

L'activation lymphocytaire est un processus complexe nécessitant la présentation de l'antigène par une CPA et la transmission de signaux de co-stimulation. La présentation aux lymphocytes T se fait par liaison entre le récepteur pour l'antigène (TCR) et les complexes CMH/antigène des CPA. Cependant, ce signal n'est pas suffisant, et nécessite une seconde stimulation délivrée par les cellules présentatrices de l'antigène (Alberts, 2002). La réponse adaptative a un fort potentiel anti-tumoral. Cependant, comme pour les cellules de l'immunité innée, les cellules cancéreuses peuvent influencer sur la réponse des lymphocytes et inhiber leur réponse. De même, les leucocytes infiltrés dans les tumeurs, tels que les TAM ou les MDSC, peuvent supprimer la réponse adaptative. Enfin, la tumeur peut favoriser l'émergence de lymphocytes Treg, dont l'activité suppressive participe à la mise en place d'un environnement tolérant pour son expansion (Lakshmi Narendra et al., 2013).

1.2.1. Les lymphocytes T CD8⁺ (CTL)

Les cellules T CD8⁺ sont les composants centraux de la réponse immune cellulaire. Ils sont impliqués dans le contrôle des infections virales ou bactériennes, et participent activement à la défense anti-tumorale. Leur action est médiée par leur habilité à cibler spécifiquement des cellules du soi compromises par une infection virale, bactérienne ou par une transformation oncogénique. Après avoir rencontré l'antigène spécifique présenté par les CPA, les lymphocytes T CD8⁺ prolifèrent et acquièrent des fonctions cytotoxiques : on parle alors de CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*). Dans un contexte tumoral, les CTL sont recrutés en réponse aux nombreuses molécules chimioattractantes relarguées par la tumeur et son environnement. Ils s'introduisent alors dans la masse tumorale et exercent leur action cytotoxique (Smyth et al., 2006).

Les CTL renferment des granules lytiques contenant de nombreuses enzymes et cytotoxines. La liaison entre le TCR et le complexe CMH/peptide induit une réorganisation du cytosquelette qui va orienter l'exocytose des granules lytiques vers la cellule cible. L'externalisation des granules libère la perforine, qui en formant des pores dans la membrane de la cellule cible, va permettre l'entrée de protéases, telles que les granzymes et induire la mort cellulaire. Il a d'ailleurs été montré que la déficience en perforine conduit au développement spontané de lymphomes et de tumeurs chimio-induites chez la Souris, ce qui montre l'importance de ce processus cytotoxique dans le contrôle du développement tumoral (Smyth et al., 2000b). Les granules lytiques ne sont pas les seuls acteurs de l'activité cytotoxique des CTL. L'interaction de FasL, une protéine membranaire de la famille du TNF- α , avec les molécules Fas présentes sur la cellule cible induit une mort par apoptose grâce à l'activation de

la voie des caspases. Finalement, la cytotoxicité médiée par les CTL est également dépendante de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ ou le TNF- α . (Prévost-Blondel et al., 2000).

Les CTL exercent de nombreuses fonctions cytotoxiques qui agissent sur les cellules cancéreuses. Leur présence dans les tumeurs est donc très souvent corrélée à un bon pronostic de survie des patients. Cependant, au cours de la progression tumorale, le taux de lymphocytes T CD8⁺, ainsi que l'activité cytotoxique qui leur est associée, diminuent. Plusieurs causes ont été avancées pour ce déclin. La présence de cytokines et autres facteurs anti-inflammatoires dans l'environnement de la tumeur peut agir sur les CTL et inhiber leur activité. La présentation des antigènes par les CPA peut être défectueuse et conduire à l'inactivation des CTL. L'absence de cytokines impliquées dans la costimulation des cellules T CD8⁺ peut également se produire dans les tumeurs et conduire à une diminution de leur activité. Finalement, la présence de cellules immunosuppressives (Treg, MDSC, TAM) peut également induire l'inactivation des CTL. L'efficacité anti-tumorale des CTL est donc largement dépendante du type de cancers et de son environnement (Prado-Garcia et al., 2012).

1.2.2. Les lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ ou auxiliaires (Th pour *T helper*) ont un rôle prépondérant dans la polarisation de la réponse immunitaire et reconnaissent les antigènes présentés par le CMH-II. Ils dérivent de précurseurs naïfs et se différencient en lymphocytes spécialisés selon le type de signaux reçus lors de leur activation (Th1, Th2 ou Th17). Ainsi, l'IL-12 va induire une différenciation de type 1 ou Th1, l'IL-4 et l'IL-13 conduisent à la formation de cellules Th2, et l'action conjointe de l'IL-6 et du TGF- β conduit à l'émergence de cellules Th17. Enfin, un dernier sous-type de cellules T auxiliaires, nommé Th3, peut être obtenu par l'action du TGF- β et/de l'IL-10. Cependant, ces lymphocytes sont particuliers, puisqu'ils possèdent un phénotype suppresseur, et sont souvent regroupés avec les lymphocytes régulateurs innés sous le terme Treg. L'orientation des lymphocytes vers leurs différents phénotypes est également largement dépendante de la nature de la CPA ainsi que des molécules de costimulation engagées dans l'interaction (Harrington et al., 2006).

Les sous-classes de lymphocytes T auxiliaires peuvent être distinguées par la nature des cytokines qu'ils produisent. Les lymphocytes Th1 sécrètent de l'IL-12, de l'IFN- γ et du TNF- α , alors que les cellules Th2 expriment de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10. Les cellules Th17, quant à elles, produisent de l'IL-6, de l'IL-17 et du TNF- α . Ces caractéristiques leur confèrent des fonctions particulières. Ainsi, les lymphocytes Th1 orientent la réponse immunitaire vers une réponse à médiation cellulaire en favorisant la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en

CTL. Ils sont donc essentiellement associés aux processus immunitaires dirigés contre les cellules infectées ou cancéreuses. Les lymphocytes Th2 sont impliqués dans les réponses immunitaires humorales. Leur intervention est prépondérante dans les réponses allergiques, où ils vont conduire à l'activation et à la prolifération des mastocytes et des éosinophiles. Finalement, les cellules Th17 sont impliquées dans le recrutement de neutrophiles lors d'infections bactériennes et participent à l'immunité des muqueuses. Un dérèglement de leur fonction est souvent observé dans les maladies inflammatoires chroniques (Zygmunt et al., 2011).

De nombreuses études ont été réalisées sur le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse anti-tumorale. Ainsi, il a été montré par des expériences de déplétion ou de transfert adoptif, que les lymphocytes Th1 ont un rôle bénéfique dans les cancers exprimant des molécules du CMH-I (Hung et al., 1998). La production de diverses chimiokines et cytokines induit le recrutement de cellules effectrices, notamment les NK et les CTL, qui pourront s'attaquer directement à la tumeur. Il a ainsi été montré que l'IFN- γ augmente l'expression du CMH-I sur les cellules cancéreuses, ce qui favorise leur reconnaissance par les CTL. L'IFN- γ inhibe également l'angiogenèse intratumorale et stimule les autres cellules immunitaires infiltrées vers une réponse anti-tumorale (Galon et al., 2006). Par conséquent, la présence de lymphocytes Th1 est associée à une croissance limitée de la tumeur et à un bon pronostic de survie. Toutefois, les cellules cancéreuses et la majorité des leucocytes de l'immunité innée produisent rapidement des cytokines immunosuppressives, ce qui va inhiber la réponse Th1 et rediriger la différenciation lymphocytaire vers des phénotypes Th2 et/ou Treg. Ces lymphocytes conduiront à un mauvais pronostic, car ils vont conduire à la suppression de l'activité des CPA et des CTL, ce qui est défavorable à la lutte anti-tumorale (Curtis et al., 2012).

1.2.3. Les lymphocytes Treg

Les lymphocytes Treg, initialement caractérisés comme des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺, expriment de manière spécifique le facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead box P3*), indispensable à leur développement et à leurs capacités immunosuppressives (Zou, 2006). Deux sous-types majeurs de cellules Treg existent : les Treg naturelles (nTreg) qui sont générées dans le thymus et agissent principalement *via* des mécanismes impliquant des contacts cellules-cellules, et les Treg inductibles (iTreg) qui apparaissent après une stimulation de type Th3 avec des CPA tolérogéniques et qui agissent principalement *via* la production de facteurs solubles (Jonuleit et al., 2001; Roncarolo et al., 2001). La population nTreg a une expression constitutive

et stable de FoxP3, alors que les iTreg présentent une certaine plasticité et peuvent être réorientés vers des phénotypes Th1, Th2 ou Th17, ou inversement (Zhou et al., 2009). Par conséquent, la stabilité des nTreg et le potentiel de conversion de cellules T effectrices en iTreg peuvent avoir tous les deux un fort impact sur le développement tumoral. Il a donc été suggéré que les deux sous-types de Treg contribuent à la tolérance immunitaire observée dans les tumeurs cancéreuses (Zhou et al., 2007). Toutefois, il a récemment été démontré que les Treg infiltrés dans des tumeurs rénales expriment FoxP3 et Helios, un facteur de transcription exprimé uniquement par les nTreg (Whiteside, 2012). Par conséquent, il est possible que dans certains types de cancers, la population nTreg ait un rôle plus important que les iTreg dans la tolérance induite, mais l'inverse a été démontré dans d'autres d'autres types de cancers (Oleinika et al., 2013).

L'accumulation des Treg dans les tumeurs cancéreuses est consécutive à trois mécanismes. Premièrement, les facteurs dérivés de la tumeur peuvent contribuer à leur recrutement. Cela est dû, au moins en partie, à la production de CCL22 par les cellules tumorales et les TAM, qui est une chimiokine reconnue par le récepteur CCR4 fortement exprimé par les Treg (Curiel et al., 2004; Nizar et al., 2009). D'autres axes chimiokines/récepteurs, comme CCL28/CCL10 ou CCL5/CCR5, ont également été impliqués dans le recrutement de Treg sur les sites tumoraux (Facciabene et al., 2011; Tan et al., 2009). Deuxièmement, la prolifération des Treg peut être favorisée au sein de la tumeur. En effet, l'IL-2 qui est une cytokine indispensable au développement des lymphocytes T, est retrouvée en quantité suffisante dans les tumeurs pour induire la prolifération des Treg. Il a d'ailleurs été montré que l'administration d'IL-2 chez des patients atteints de tumeurs rénales induisait la prolifération des Treg (Jensen et al., 2009b). Le TGF- β , également présent en abondance dans de nombreux microenvironnements tumoraux, peut participer à la prolifération des Treg (Ghiringhelli et al., 2005). Finalement, les lymphocytes Treg peuvent se différencier *de novo* à partir de lymphocytes CD4⁺ naïfs nouvellement recrutés. Le rôle du TGF- β dans ce phénomène est aujourd'hui bien établi (Zhou et al., 2007). D'autres facteurs dérivés des tumeurs ont également été impliqués dans la génération de Treg, comme l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase (Curti et al., 2007). Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore clairement élucidés (Oleinika et al., 2013).

Une fois infiltrées dans les tumeurs, les Treg utilisent plusieurs voies pour supprimer la réponse immunitaire. Tout d'abord, elles sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β qui sont capables d'inhiber les activités de nombreuses cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif (Shevach, 2002). Elles entrent en compétition avec les

autres cellules T pour la consommation d'IL-2. En effet, contrairement aux autres lymphocytes T qui expriment le récepteur à l'IL-2 sous sa forme dimérique (CD122/CD132), les Treg expriment un récepteur trimérique (CD25/CD122/CD132), et ce dernier est 100 fois plus affiné pour l'IL-2 que le récepteur classique. En consommant l'IL-2 présente dans les tumeurs, les Treg empêcheraient l'expansion des cellules T effectrices (von Boehmer, 2005). Les Treg sont également capables, *via* un mécanisme dépendant de la perforine et du granzyme B, de lyser les cellules T et les CPA (Gondek et al., 2005). Finalement, elles expriment l'indoléamine 2,3-dioxygénase, ce qui a pour effet de promouvoir la tolérance immunitaire (Fallarino et al., 2003), et induisent l'expression de B7-H4 par les CPA, une molécule inhibitrice de la stimulation antigénique des lymphocytes T effecteurs (Zou, 2006).

L'activité des Treg est donc responsable de l'apparition d'un environnement tolérant incapable de médier une réponse anti-tumorale efficace. Ainsi, la présence de ces cellules a été corrélée à un mauvais pronostic de survie et à une progression plus rapide des cellules cancéreuses (Sato et al., 2005). Toutefois, ces données sont actuellement controversées, car il a été montré que la propriété des Treg à inhiber l'inflammation est un moyen de lutte efficace contre la tumeur. En effet, l'inflammation favorise l'expansion tumorale en stimulant la prolifération des cellules cancéreuses, l'angiogenèse et la formation des métastases. Ainsi, comme pour les autres cellules du système immunitaire, le rôle des Treg pourrait être dépendant du microenvironnement tumoral et du type de cancer (Whiteside, 2012).

1.2.4. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont principalement connus pour leur rôle dans la production d'anticorps. Cependant, ils participent aussi à d'autres processus immunitaires, tels que la présentation d'antigènes et la production de cytokines capables de moduler l'activité des lymphocytes T et des cellules dendritiques (Alberts, 2002). Leur rôle dans l'immunité anti-tumorale n'a cependant été que très peu étudié en comparaison avec les travaux effectués sur les lymphocytes T. Ils participeraient essentiellement à la réponse anti-tumorale en produisant des anticorps spécifiques capables de déclencher une réponse ADCC (Clynes et al., 2000). Par exemple, une forme mutée de la protéine B-Raf est retrouvée dans 80% des mélanomes humains, et il a été reporté la présence d'anticorps contre un épitope de cette protéine mutée dans le sérum de nombreux patients atteints de ce cancer (Jarkowski et al., 2014).

Comme pour les autres cellules immunes, les lymphocytes B pourraient également contribuer dans certains cas à la progression tumorale (Fremd et al., 2013). En effet, des études réalisées chez la Souris ont montré que l'absence de cellules B conduit à une diminution de

l'infiltration de leucocytes au sein des tumeurs et à une diminution de la croissance tumorale (de Visser et al., 2005). Ainsi, il a été montré que les anticorps sont capables d'interagir avec les cellules immunes *via* leurs récepteurs FcR et d'induire une réponse suppressive favorable à la croissance tumorale. D'autre part, une sous-population de lymphocytes B à activité immunosuppressive, dénommée Breg, a récemment été décrite. Ces dernières sécrètent en abondance de l'IL-10, du TGF- β et de l'IL-4. Cette dernière cytokine agit sur les lymphocytes T et les macrophages, et va donc favoriser l'acquisition des phénotypes respectifs Th2 et M2, favorables à la progression tumorale (Schioppa et al., 2011). Par conséquent, les réponses médiées par les lymphocytes B nécessitent encore de nombreuses investigations avant de comprendre le rôle de ces cellules dans l'immunité tumorale.

II. L'échappement à la réponse anti-tumorale

En dépit de la surveillance par le système immunitaire, il est fréquent d'observer que les cellules cancéreuses échappent à l'action des leucocytes et continuent à proliférer. Cet échappement n'est pas immédiat, mais apparaît en même temps que la tumeur évolue, ce qui se traduit par des changements progressifs des caractéristiques immunologiques de l'environnement tumoral (Smyth et al., 2006).

Les réponses immunes innée et adaptative interviennent dans la reconnaissance des tumeurs cancéreuses et conduisent normalement à leur élimination. Cependant, la tumeur évolue et ces réponses ne sont plus suffisantes pour éliminer les cellules malignes : on préfère donc aujourd'hui le terme d'immuno-édition à celui d'immunosurveillance pour parler des relations entre le système immunitaire et les tumeurs (Dunn et al., 2002). Ce concept sous-entend qu'une fois la tumeur reconnue par le système immunitaire, ce dernier va stabiliser la prolifération des cellules cancéreuses et tout mettre en œuvre pour éliminer les antigènes immuno-dominants. Les cellules cancéreuses vont donc être soumises à une pression de sélection, ce qui va les amener à développer des systèmes pour se mettre hors de portée du système immunitaire. Il en résultera l'émergence de cellules faiblement immunogènes, et dans la majorité des cas, productrices de facteurs suppresseurs qui permettront la mise en place d'un environnement immunitaire tolérant et favorable à leur croissance et à leur dissémination (Mumm et al., 2011).

Les mécanismes qui conduisent à rendre les cellules cancéreuses indétectables par le système immunitaire peuvent être classés en deux catégories : la modification de l'immunogénicité des cellules cancéreuses et la subversion du système immunitaire.

2.1. Modifications de l'immunogénicité

La perturbation des mécanismes d'apprêtement des antigènes, de présentation et/ou de costimulation conduisent à un dysfonctionnement de l'immunité adaptative. Il a ainsi été reporté que de nombreuses cellules tumorales ont une expression réduite du CMH-I et de certaines molécules de costimulation, ce qui peut expliquer leur sensibilité moindre à l'action des CTL. La perte de ces récepteurs est liée à des modifications génétiques dans les cellules cancéreuses ou à l'action de protéases libérées dans l'environnement tumoral (Reiman et al., 2007; Wilczyński et al., 2010). Par exemple, des modifications au niveau du transporteur TAP1 (*Transporter associated with Antigen Processing 1*) ou des sous-unités de l'immunoprotéasome altèrent l'apprêtement des antigènes, ce qui conduit à une mauvaise présentation au système immunitaire adaptatif (Seliger et al., 2000). L'absence de molécules de costimulation (CD80/86) à la surface des cellules tumorales conduit à la génération de lymphocytes T CD4⁺ anergiques, et par conséquent incapables de proliférer (Byrne et al., 2003). Enfin, les cellules tumorales peuvent supprimer l'expression de certains antigènes, en réponse à une pression de sélection exercée par le système immunitaire. Ainsi, il a été reporté qu'une thérapie adoptive en cellules T CD8⁺ contre des mélanomes perd très rapidement son efficacité par élimination de l'antigène MART-1 (*melanoma antigen recognized by T cells 1*) à la surface des cellules ciblées (Kageshita et al., 2001).

Ces mécanismes n'expliquent toutefois pas comment les cellules cancéreuses peuvent également échapper à l'action des cellules du système inné. Dans ce cas, il a été suggéré que la reconnaissance de nouveaux marqueurs cancéreux par les récepteurs KIR des cellules NK conduit à une inhibition de leur activité lytique. En effet, l'IL-10 ou encore l'hypoxie induisent l'expression de HLA-G (*Human Leukocyte Antigen*), un antigène non classique du CMH-I (Mouillot et al., 2007; Urosevic et al., 2003). Cet antigène est reconnu par les récepteurs KIR, ce qui conduit à l'inhibition de la réponse des cellules NK qui ne pourront plus lyser les cellules cancéreuses. Les récepteurs KIR impliqués dans la reconnaissance de HLA-G sont KIR2DL4/p49, ILT-2 (*Immunoglobulin-Like Transcript-2*) et ILT-4. Ces récepteurs sont également retrouvés sur les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules dendritiques. Ainsi, HLA-G n'agirait pas seulement sur les cellules NK mais de façon plus général en inhibant les activités des cellules tumoricides (Gomes et al., 2007; Urosevic et al., 2008). La molécule HLA-G peut également se retrouver sous une forme sécrétée dans les tumeurs. Sous cette forme soluble, elle est capable d'induire l'apoptose des CTL, *via* un mécanisme dépendant de Fas. La concentration en HLA-G soluble dans les tumeurs a d'ailleurs été corrélée à leur taille (Pistoia et al., 2007). D'autres facteurs apparentés au CMH-I sont également retrouvés

sous forme sécrétée dans les tumeurs. Ils perturbent les réponses cytotoxiques des CTL et NK, en inhibant par exemple l'expression de récepteurs activateurs des NK, tels que NKG2D ou NKp44, et des récepteurs à chimiokines CCR7 et CXCR1 (Dobrovina et al., 2003).

2.2. Subversion du système immunitaire

Alors que les cellules du système immunitaire ont pour fonction première de participer à la lutte anti-tumorale, elles peuvent être « désactivées » par des facteurs produits par les cellules cancéreuses ou par l'environnement de la tumeur. Ce processus conduit soit à la mort cellulaire des leucocytes infiltrés, soit à une modification de leur phénotype, les privant ainsi d'activité tumoricide et/ou leur conférant des propriétés pro-tumorales (Stewart et al., 2008).

Les cellules cancéreuses expriment des récepteurs de mort cellulaire de la famille des TNF-R, tels que Fas. En ciblant ce récepteur, les leucocytes cytotoxiques sont capables d'induire un signal pro-apoptotique *via* l'expression de FasL, conduisant à la réponse anti-tumorale et au retour à l'homéostasie (Siegel et al., 2000). Toutefois, les cellules cancéreuses peuvent également exprimer FasL, ce qui leur permettrait d'induire un signal de mort aux lymphocytes T activés exprimant Fas (Andreola et al., 2002). Ainsi, il a été montré que l'absence d'expression de Fas réduit la progression d'un mélanome induit chez la Souris (Hahne et al., 1996). Toutefois, cet effet semble dépendre du modèle utilisé, puisqu'une autre équipe a reporté que la surexpression de FasL dans un mélanome murin est corrélée à une réponse immune anti-tumorale efficace (Khong et al., 2002). Les différences d'expression de FasL seraient à l'origine de ces résultats contradictoires. En effet, il a ensuite été démontré qu'une faible expression de FasL induit l'apoptose des lymphocytes T anti-tumoraux, alors que sa surexpression favorise un rejet tumoral associé à une forte infiltration de neutrophiles (Wada et al., 2007). D'autres molécules exprimées par les cellules cancéreuses, tels que TRAIL, auraient des effets similaires et participeraient à l'apoptose de leucocytes infiltrés (Giovarelli et al., 1999). PD-L1 et PD-L2 sont des molécules immunosuppressives capables de reconnaître le récepteur de co-stimulation PD-1 (*Programmed cell Death-1*) exprimé par les lymphocytes T (Blank et al., 2005). Ces deux molécules ont été identifiées à la surface de nombreux types de cellules cancéreuses et seraient capables de bloquer l'activité anti-tumorale des lymphocytes infiltrés. Il a notamment été montré que le blocage de PD-L1 par un anticorps spécifique est suffisant pour éliminer différents types de tumeurs induites (Dong et al., 2002).

Outre ces mécanismes dépendant d'un dialogue entre les cellules tumorales et les leucocytes tumoricides, l'environnement tumoral libère de nombreux facteurs solubles capables de « reprogrammer » les leucocytes infiltrés et de bloquer leur fonction anti-tumorale. Les

cytokines ont un rôle prépondérant dans l'orientation de la réponse anti-tumorale. Alors que l'IL-12 et l'IFN- γ induisent une réponse immune Th1 favorable à l'activité anti-tumorale, les cytokines de types Th2, telles que l'IL-4, ont l'effet inverse en s'opposant notamment à la réponse Th1. La production de ces cytokines peut être assurée par les cellules tumorales elles-mêmes ou par des leucocytes reprogrammés par l'environnement tumoral. Ainsi, il a été suggéré que l'hypoxie retrouvée dans les tumeurs solides est suffisante pour induire la réponse immune de type 2 (Johansson et al., 2008). En plus de l'IL-4, la production de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β conduit à l'inactivation des leucocytes nouvellement infiltrés et donc à l'arrêt de la réponse anti-tumorale (Dunn et al., 2004; Stewart et al., 2008).

L'IL-10 est une cytokine présentant un fort pouvoir immunosuppresseur. Elle peut agir sur les CPA ou directement sur les cellules T effectrices, et va réduire l'expression des cytokines de type 1 et inhiber la prolifération des cellules T en réponse à un antigène. Une concentration élevée en IL-10 est retrouvée dans de nombreux types de tumeurs, car elle peut être produite par les cellules cancéreuses elles-mêmes ainsi que par certains leucocytes infiltrés. Ainsi, les MDSC et les macrophages M2 associés aux tumeurs sont de gros producteurs d'IL-10 (Sato et al., 2011). Le TGF- β est une autre cytokine fortement exprimée dans de nombreux cancers. Comme l'IL-10, il inhibe la prolifération des lymphocytes T et leur différenciation en CTL. Ainsi, il a été reporté que les tumeurs présentant de forts taux de TGF- β sont particulièrement agressives. De nombreux types de cellules cancéreuses, ainsi qu'une sous-population de macrophages M2, sont à l'origine de la production de TGF- β au sein des tumeurs (Caja et al., 2014).

Finalement, l'IL-4 est un élément clé de la réponse immune dans les tumeurs. Elle est souvent retrouvée en abondance dans le microenvironnement de nombreux types de cellules cancéreuses, puisque les lymphocytes Th2 et les cellules NKT infiltrées sont capables d'en produire de grandes quantités. En plus de diriger les lymphocytes T naïfs vers un phénotype Th2, cette cytokine agit sur les macrophages et est responsable de leur polarisation en cellules M2 (Wang et al., 2010). L'interaction de cette cytokine « pro-tumorale » avec les cellules immunes conduit à la production de nombreux facteurs solubles, notamment des enzymes et des facteurs de croissance, qui vont stimuler la croissance tumorale en inhibant les réponses cytotoxiques et/ou en favorisant la prolifération des cellules cancéreuses. Par exemple, l'indoléamine 2,3-dioxygénase est surexprimée dans les macrophages en réponse à l'IL-4. Cette enzyme régule la réponse immune en catabolisant le tryptophane, ce qui a pour effet de supprimer les fonctions effectrices des lymphocytes T. De même, l'arginase-1 est exprimée

principalement par les macrophages M2 et favorise la croissance tumorale. En effet, le catabolisme de l'arginine conduit à la formation d'ornithine, un précurseur de la biosynthèse des polyamines qui sont d'importants promoteurs tumoraux. Finalement, l'IL-4 induit la production de facteurs de croissance, tels que le VEGF, le FGF-2 et l'EGF, qui participe directement à la prolifération des cellules tumorales ainsi qu'à la promotion de l'angiogénèse (Smyth et al., 2006).

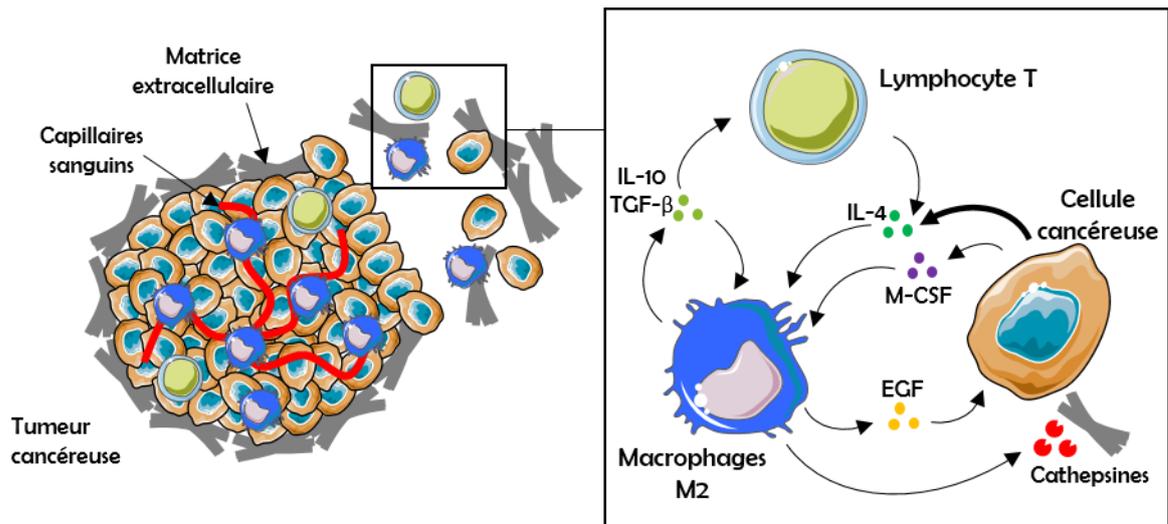


Figure 15: Le rôle majeur de l'IL-4 dans l'activation alternative (M2) des macrophages associés aux tumeurs (TAM). L'environnement tumoral comprend une variété de cellules différentes et de composants des matrices extracellulaires. Les interactions complexes entre ces différents constituants conduisent à l'acquisition par les TAM d'un phénotype pro-tumoral. L'IL-4, sécrété soit par les lymphocytes T soit par les cellules tumorales, agit sur les TAM et participe ainsi à l'acquisition de ce phénotype (d'après (Wang et al., 2010))

III. Les métastases et le système immunitaire

Le processus métastatique correspond à la dissémination des cellules d'une tumeur primaire *via* la circulation sanguine ou lymphatique vers des tissus localisés à distance. En effet, au cours de leur transformation maligne, les cellules cancéreuses acquièrent de nouvelles caractéristiques leur permettant de se dissocier des tissus primaires, de dégrader les matrices extracellulaires, de rejoindre la circulation et de coloniser de nouveaux tissus. Les modifications de glycosylation, tant au niveau des cellules cancéreuses que de l'environnement tumoral, jouent un rôle essentiel dans le processus métastatique (Häuselmann et al., 2014).

3.1. Formation des métastases

Il est aujourd'hui bien établi que la survenue de métastases n'est pas gouvernée par des événements aléatoires. Une étude sur plus de 700 cas de cancers du sein avait déjà montré en

1989 que les cellules colonisent préférentiellement le foie plutôt que d'autres organes. Cette observation a donné naissance à la théorie « de la graine et du sol », qui énonce que les cellules tumorales (« graines ») se disséminent seulement sur des sites favorables et particuliers (« sol ») (Paget, 1989). Plus récemment, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires sous-jacents à cette sélectivité. Il est maintenant démontré que les métastases ne sont pas seulement régulées par des modifications génétiques intrinsèques aux cellules tumorales mais également par le microenvironnement tumoral. En effet, alors que les modifications génétiques et épigénétiques sont à l'origine de la carcinogenèse, les cellules stromales présentes dans les tissus néoplasiques favorisent et/ou régulent la progression vers la malignité et la propagation des métastases. Les cellules stromales qui participent à ces processus sont variées : fibroblastes, cellules endothéliales, leucocytes infiltrés ou encore cellules mésenchymateuses. Ces dernières années, de nombreux travaux ont souligné l'importance des leucocytes infiltrés dans la survenue des métastases, tant au niveau de la tumeur primaire que de la niche métastatique secondaire (Balkwill et al., 2005; de Visser et al., 2006; Labelle et al., 2012).

La propagation de cellules cancéreuses est un processus séquentiel, dont les étapes sont interdépendantes pour son aboutissement (Chambers et al., 2001). De manière générale, les premières étapes regroupent la transformation des cellules malignes, leur évasion locale, suivie de leur entrée dans la circulation sanguine, encore appelée intravasation. Puis, les cellules cancéreuses doivent survivre dans la circulation et s'arrêter au contact de certains endothéliaux afin de sortir de la vasculature. Cette sortie s'effectue soit par extravasation, processus également utilisé par les leucocytes pour rejoindre les sites inflammés, soit par rupture des vaisseaux sanguins. Une fois dans les tissus secondaires, les cellules malignes vont proliférer pour établir une tumeur secondaire (Fidler, 2003).

La transformation des cellules tumorales est l'étape la plus limitante. Bien que la plupart des cancers soient initialement monoclonaux, les cellules qui métastasent diffèrent de celles de la tumeur primaire, puisqu'elles acquièrent de nouvelles propriétés leur permettant par la suite de se disséminer (Morita et al., 1998). Parmi ces modifications, les plus marquantes sont la perte de l'expression de certaines molécules d'adhérence (cadhérines, intégrines) et l'induction d'un environnement pro-angiogénique et tolérant face à la dissémination cellulaire (Nguyen, 2004). Les cellules métastatiques doivent ensuite se décrocher de la tumeur primaire, ce qui est facilité par un remodelage des matrices extracellulaires. Les facteurs impliqués dans ce processus sont principalement des métalloprotéases et des molécules d'adhérence, comme la fibronectine, qui sont sécrétées par les cellules cancéreuses ou par l'environnement tumoral.

Les cellules métastatiques doivent ensuite acquérir la capacité à migrer, ce qui est rendu possible par l'expression de molécules membranaires faisant le lien entre le cytosquelette et les matrices extracellulaires. Par exemple, le CD44 est souvent surexprimé dans les cancers. Par sa propriété à lier l'acide hyaluronique, il permet aux cellules cancéreuses de migrer à travers les tissus dégradés, souvent riches en acide hyaluronique accessible (Dietrich et al., 1997). Les cellules cancéreuses peuvent alors sortir du tissu primaire et rejoindre la circulation. Elles deviennent alors très vulnérables, puisqu'on considère que seulement 0,01% des cellules métastatiques parviennent à survivre dans la circulation et à coloniser un nouveau tissu (Weiss, 1990).

La colonisation métastatique nécessite que les cellules cancéreuses s'arrêtent au niveau de certains endothélia. Cette étape ferait intervenir de nombreuses molécules d'adhérence, dont les sélectines, et des éléments du sang, telles que les plaquettes et certains leucocytes (Reymond et al., 2013). Finalement, les cellules doivent proliférer dans le nouveau tissu, en dépit des défenses immunitaires et du nouvel environnement généralement peu propice au développement tumoral.

Les mécanismes qui gouvernent la migration des cellules cancéreuses et leur survie dans les tissus secondaires sont encore mal connus. De nombreuses théories ont vu le jour pour expliquer la sélectivité des métastases, mais elles sont souvent contradictoires. Par exemple, la théorie du « homing » suggère que les organes distants des sites tumoraux primaires attirent et/ou arrêtent les cellules en migration *via* la liaison à des récepteurs d'adhérence, comme les sélectines, et/ou *via* la sécrétion de facteurs chimioattractants, comme les chimiokines (J. Wilson et al., 2002). L'identification de récepteurs sur les cellules endothéliales qui lient spécifiquement les cellules malignes conforte cette théorie (Borsig et al., 2002). Par contre, la théorie du « sol fertile » suggère que l'environnement présent dans les différents organes fournit uniquement des conditions de croissance optimales pour certains types cellulaires circulants. Etant donné que ces théories ne sont pas mutuellement exclusives, il est probable que des mécanismes tissu-spécifiques et cancer-spécifiques régissent la migration des cellules malignes et leur survie dans les tissus ectopiques (DeNardo et al., 2008).

3.2. Processus inflammatoires pro-métastatiques

Les tumeurs cancéreuses sont le siège d'une forte infiltration leucocytaire. Toutefois, plutôt que de lutter efficacement contre l'invasion tumorale, les leucocytes infiltrés agissent souvent en faveur de son expansion en raison de leur activation alternative. Une des conséquences est la libération de nombreux facteurs solubles qui vont favoriser le remodelage

des matrices extracellulaires et l'angiogénèse (Bergers et al., 2003). Un tel environnement tumoral n'est donc pas uniquement favorable au développement de la tumeur primaire, mais également à la dissémination des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine (Condeelis et al., 2006).

3.2.1. L'angiogénèse

Le potentiel des cellules cancéreuses à se propager localement ou de manière systémique est largement dépendant de l'angiogénèse tumorale (Hanahan et al., 2000). En effet, les capillaires sanguins associés aux tumeurs favorisent la croissance tumorale et fournissent des voies d'échappement pour les cellules malignes qui pourront ainsi rejoindre la circulation (Wyckoff et al., 2004). L'angiogénèse tumorale peut être contrôlée par les cellules cancéreuses elles-mêmes, qui sécrètent des facteurs pro-angiogéniques (Lee et al., 2007), mais leur action est le plus souvent renforcée par les cellules immunes infiltrées au sein de la tumeur (Condeelis et al., 2006).

Dans de nombreux types de cancers, les macrophages représentent la majorité des leucocytes infiltrés et participent largement à l'angiogénèse, en produisant des facteurs, comme le VEGF, et des protéases, comme l'uPA (*urokinase-type Plasminogen Activator*) ou MMP-9 (Lin et al., 2007b). Une étude réalisée sur un modèle murin de carcinome mammaire hautement métastatique (souris MMTV-PyMT (*Mouse Mammary Tumor Virus- Polyoma virus middle T antigen*)) a montré l'importance du M-CSF dans la survenue des métastases. En effet, l'angiogénèse, la croissance tumorale et l'apparition des métastases pulmonaires sont fortement réduites chez les souris déficientes en M-CSF, ce qui serait lié à un défaut de recrutement et de différenciation des macrophages dans la tumeur (Lin et al., 2002). De plus, les macrophages sont capables d'influer sur la formation des métastases à distance de la tumeur primaire, en modulant la motilité et l'extravasation des cellules cancéreuses (Goswami et al., 2005). Ainsi, il a été montré que la quantité de macrophages infiltrés est directement corrélée à la densité des microvaisseaux, à la taille de la tumeur, ainsi qu'à un mauvais pronostic de survie (Bolat et al., 2006).

Le recrutement d'autres cellules immunes, telles que les MDSC, les neutrophiles ou les monocytes Tie2⁺, a également un impact sur l'angiogénèse tumorale, car ces cellules sécrètent également des facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF, l'IL-8, des MMPs ou l'élastase. Comme les macrophages M2, ces cellules immunes favorisent la progression et la conversion maligne, en stimulant l'angiogénèse et en facilitant la dissémination des cellules tumorales dans la circulation (DeNardo et al., 2008; De Palma et al., 2005).

3.2.2. Remodelage tissulaire et intravasation

En plus d'induire la néo-angiogenèse dans les tumeurs, les leucocytes infiltrés régulent l'apparition de métastases en augmentant le potentiel invasif des cellules cancéreuses *via* la production de protéases, de cytokines et de facteurs de croissance (Balkwill et al., 2005).

Les protéases facilitent la dissémination des cellules cancéreuses de la tumeur primaire en dégradant des composants des matrices extracellulaires. Cela a pour effet de déstabiliser les interactions cellules-matrices, ce qui confère aux cellules cancéreuses un plus grand potentiel invasif. En outre, certains produits de dégradation des matrices peuvent directement agir sur les cellules tumorales. Par exemple, les fragments libérés par action de la MMP2 sur la chaîne γ 2 de la laminine-5 sont capables d'activer le récepteur EGFR présent sur certains types de cellules tumorales, ce qui augmente leur potentiel invasif (Pirilä et al., 2003). L'action des protéases conduit aussi au relargage de facteurs de croissance séquestrés dans les matrices extracellulaires. Par exemple, l'action de la MMP7 est nécessaire à la libération sous forme active du facteur de croissance HB-EGF (*Heparin-binding EGF-like growth factor*) (Cheng et al., 2007).

En plus des protéases, les leucocytes infiltrés sécrètent des facteurs de croissance, des chimiokines et des facteurs morphogéniques qui stimulent la survie, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. Les macrophages infiltrés, par exemple, sécrètent en abondance le FGF-2, l'HGF, l'EGF, l'HB-EGF et le PDGF (Condeelis et al., 2006). Ainsi, les macrophages sont la source majeure d'EGF dans le microenvironnement des tumeurs mammaires (Lewis et al., 2006). Les gradients de concentration formés par ces facteurs de croissance coordonnent la migration des cellules cancéreuses vers les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs et favorisent leur intravasation. De plus, une boucle paracrine a été mise en évidence entre les cellules mammaires tumorales et les macrophages. Ces derniers sécrètent de l'EGF à destination des cellules tumorales, et celles-ci produisent en retour du M-CSF (Wyckoff et al., 2007). Le dialogue entre leucocytes infiltrés et cellules cancéreuses aura pour effet d'exacerber la croissance tumorale et de faciliter la dissémination des cellules cancéreuses dans la circulation.

3.2.3. Circulation et extravasation des cellules métastatiques

Une fois entrées dans la circulation, les cellules cancéreuses ne sont plus protégées du système immunitaire et peuvent donc être lysées par les leucocytes circulants. Cependant, une faible proportion survit à cette élimination et finit par coloniser de nouveaux tissus. En outre, plusieurs mécanismes peuvent influencer sur la survie des cellules cancéreuses circulantes. Par

exemple, certains facteurs tels que le TNF- α , l'épîréguline ou l'IL-6, présents naturellement dans le sang ou dérivés de la tumeur primaire, peuvent augmenter le taux de survie des cellules métastatiques (Kim et al., 2009; Nguyen et al., 2009). Leur interaction avec des cellules présentes dans la circulation peut aussi les protéger du système immunitaire (Pawelek et al., 2008). Il a ainsi été montré que les cellules métastatiques forment des agrégats avec les leucocytes et les plaquettes, ce qui a un effet protecteur vis-à-vis de la lyse médiée par les cellules NK (Gassmann et al., 2008). Ce phénomène repose, au moins en partie, sur l'expression par les cellules tumorales du facteur tissulaire, qui permet d'agrégier des plaquettes et de la fibrine (Palumbo et al., 2007). Les agrégats auraient d'ailleurs également un rôle important dans le ralentissement et l'arrêt des cellules métastatiques sur l'endothélium. En effet, il a été montré qu'un taux élevé de plaquettes est corrélé à un mauvais pronostic de survie dans plusieurs types de cancers (Smith et al., 2013).

La migration des cellules métastatiques est largement dépendante des gradients de chimiokines, notamment celles liant les CXCR4, CCR4, CCR7 et CCR9. Ces interactions favorisent le passage des cellules cancéreuses à travers la barrière endothéliale et leur entrée dans les tissus secondaires (Bonicchi et al., 2009).

Le processus d'extravasation des cellules métastatiques se déroule en plusieurs étapes. Les cellules cancéreuses sont d'abord ralenties grâce aux interactions transitoires entre les molécules d'adhérence qu'elles expriment et celles exprimées par les cellules endothéliales. Cette étape de « roulement » est médiée en grande partie par les sélectines E et P exprimées par les cellules endothéliales, et leurs ligands exprimés par les cellules cancéreuses, notamment les motifs sialyl-Lewis X et sialyl-Lewis a (sLex et sLea). Ces motifs glycaniques sont présents sur différentes glycoprotéines ou glycolipides exprimés par les cellules cancéreuses : PSGL-1, ESL-1 (*E-Selectin Ligand 1*), mucines, CD44, et gangliosides (Strell et al., 2008). Les sélectines peuvent également interagir avec des glycanes sulfatés, tels que les GAGs, les fucoidanes et certains glycolipides sulfatés (Läubli et al., 2010). Après cette première phase de roulement vient l'étape d'adhérence ferme médiée par les intégrines. Ces récepteurs hétérodimériques sont capables d'interagir avec des composants de la MEC (Matrice Extracellulaire) et des composants membranaires, et leur implication dans les métastases a clairement été démontrée (Desgrosellier et al., 2010). Les cellules cancéreuses expriment plusieurs types d'intégrines, ce qui leur permet de se fixer sur de nombreux ligands endothéliaux, tels que les ICAM et VCAM. Le passage des cellules métastatiques à travers l'endothélium, nommé diapédèse, se fait par rupture de jonctions serrées entre cellules endothéliales (Vestweber, 2012). Il a aussi

été suggéré que les cellules cancéreuses pourraient passer directement à travers les cellules endothéliales (Carman et al., 2008).

L'extravasation des cellules métastatiques est donc dépendante de l'expression de molécules d'adhérence par les cellules cancéreuses et endothéliales. De nombreuses cytokines surexprimées dans les tumeurs cancéreuses peuvent agir à distance sur l'expression de ces molécules d'adhérence par les cellules endothéliales au niveau des organes cibles (Pierce et al., 2009). Ainsi, l'expression de ces molécules d'adhérence induite à distance par la tumeur primaire pourrait contribuer à l'entrée des cellules métastatiques dans de nouveaux tissus. En plus de protéger les cellules tumorales du système immunitaire, les éléments circulants du sang participent également à leur extravasation. Les plaquettes sont les premières à interagir avec les cellules cancéreuses. En effet, ces dernières favorisent la formation d'agrégats en exprimant la thrombine, un activateur de l'adhérence plaquettaire (Gil-Bernabé et al., 2013). Inversement, l'inhibition ou la déplétion des plaquettes réduit l'apparition de métastases dans des modèles murins (Camerer et al., 2004). Ainsi, les plaquettes facilitent l'extravasation des cellules cancéreuses en augmentant leur adhérence à l'endothélium, *via* notamment l'expression de la P-sélectine. En outre, leur intervention pourrait expliquer la spécificité d'organe des métastases. En effet, il a été montré qu'elles favorisent les métastases de mélanomes vers le poumon mais n'ont pas d'effet sur les métastases au foie (Coupland et al., 2012).

3.2.4. Préparation des sites pré-métastatiques

La survie des cellules métastatiques dans un tissu secondaire est un évènement rare, dont les mécanismes ne sont pas tous élucidés. Plusieurs études ont impliqué la protéase MMP-9 produite par les macrophages et le récepteur VEGF-R1 des cellules endothéliales dans la survie des métastases au poumon. En effet, il a été montré que les TAM peuvent circuler de la tumeur primaire vers les organes distants. Ainsi, les tissus exprimant le VEGF-R1 et riches en macrophages inducteurs de MMP-9 sont des zones fertiles pour la formation d'une niche métastatique secondaire (Bergers et al., 2000). Toutefois, le rôle de la MMP-9 dans la préparation des niches secondaires serait dépendant du type de cancers ainsi que des organes où s'établiront les foyers métastatiques. En effet, une autre étude a montré que la MMP-9 sécrétée par les leucocytes augmentent la survie de cellules cancéreuses mais n'a pas d'effet sur la croissance du foyer métastatique (Acuff et al., 2006). Au contraire, la MMP-9 dérivée des cellules de Küpfer facilite la formation des foyers métastatiques de cellules cancéreuses du colon dans le foie (Gorden et al., 2007).

D'autres molécules ont été impliquées dans la préparation des sites métastatiques. Par exemple, la production de VEGF, de TGF- β et de TNF- α par la tumeur primaire induit l'expression des protéines S100A8 et S100A9 par l'endothélium pulmonaire et les cellules myéloïdes, ce qui favorise le recrutement des cellules tumorales dans le parenchyme pulmonaire (Hiratsuka et al., 2006). Les principaux producteurs de ces facteurs sont les leucocytes infiltrés dans les tumeurs primaires, ce qui confirme que ces cellules immunes peuvent contrôler la formation de niches pré-métastatiques distantes en libérant des facteurs dans la circulation (Condeelis et al., 2006). Il a également été reporté que des cellules dérivées de la moelle osseuse et exprimant le VEGF-R1 sont recrutées sur les sites pré-métastatiques avant même l'arrivée des cellules métastatiques. Ces cellules hématopoïétiques sont dirigées préférentiellement vers les sites pré-métastatiques et favorisent ensuite le recrutement des cellules tumorales. En effet, l'injection sous-cutanée de cellules issues de carcinome pulmonaire de Lewis ou de mélanomes B16 induit le recrutement des cellules exprimant le VEGF-R1 dans les poumons et le foie, qui sont respectivement les sites où les cellules cancéreuses vont métastaser (Kaplan et al., 2006). Ainsi, il est maintenant admis que les facteurs dérivés de la tumeur primaire sont les principaux responsables de la préparation des sites pré-métastatiques afin de les rendre propices à la colonisation par des cellules cancéreuses.

Chapitre 3 : Les GAGs et le cancer

De nombreuses études ont montré que la transformation maligne est accompagnée d'une modification du profil d'expression des protéoglycanes ainsi que d'une altération des structures des GAGs associés. Ces changements sont consécutifs à des modifications génétiques et épigénétiques affectant les cellules cancéreuses et à l'action de facteurs produits dans l'environnement tumoral, qui vont perturber l'expression des protéoglycanes et celle des enzymes impliquées dans la biosynthèse des GAGs (Sasisekharan et al., 2002).

L'expression des syndécans et des glypicans est modulé dans de nombreux cancers, et certains de ces protéoglycanes ont même été proposés comme biomarqueurs dans certains types de cancers (Barbouri et al., 2014; Filmus, 2001). C'est le cas du syndécan-1 (CD138), dont l'expression est augmentée dans les nombreux cancers solides : sein, colon, prostate, estomac, utérus, pancréas, ovaires, larynx, ainsi que dans les lymphomes, et sa surexpression est en général corrélée à un mauvais pronostic de survie des patients (Yip et al., 2006). L'expression du glypican-3, quant à elle, est la plupart du temps réduite voire éteinte dans les cancers, à l'exception des mélanomes où son expression est accentuée. Son absence est d'ailleurs souvent corrélée à un phénotype agressif des cellules cancéreuses. En outre, les mutations affectant son gène sont associées à l'apparition du syndrome SGBS (*Simpson-Golabi-Behmel*), qui a été décrit comme un facteur de prédisposition pour les cancers rénaux (Ho et al., 2011).

L'expression des enzymes de biosynthèse des HS est souvent impactée par la cancérisation des cellules. Par exemple, l'expression de la 3-OST2 est abolie dans les cancers du sein, du poumon, du colon et du pancréas (Miyamoto et al., 2003). De même, les enzymes EXT sont souvent sous-exprimées dans les cancers. Elles sont d'ailleurs considérées comme des suppresseurs de tumeurs, puisqu'elles préviennent la progression des ostéochondromes vers le stade chondrosarcome (Schrage et al., 2009). A l'inverse, certaines enzymes sont surexprimées dans les cellules cancéreuses : c'est le cas de la 6-OST2 dans les cancers colorectaux (Hatabe et al., 2013), de la 2-OST dans les cancers de la prostate (Ferguson et al., 2011) ou de la 3-OST3B dans les cancers du pancréas (Song et al., 2011). Il en est de même pour certaines enzymes de biosynthèse des CS/DS. Ainsi, l'expression de la CHSY3, de la CHST3 et de la D4ST1 est diminuée dans les cancers du larynx, alors que celle de la DSE est augmentée (Kalathas et al., 2010). Enfin, les HS peuvent être modifiés après leur biosynthèse par les Sulfs et l'héparanase. L'expression de ces enzymes est très souvent altérée dans les cancers, ce qui a pour effet de modifier la structure mais également les fonctions associées aux HS (Vivès et al., 2014).

Des mutations affectant les gènes codant pour les protéoglycanes ou pour les enzymes de biosynthèse des GAGs sont souvent retrouvées dans les cellules cancéreuses. Lorsque ces mutations ne sont pas silencieuses, il en résulte une invalidation du gène ou la production d'une forme inactive ou altérée de la protéine (Yoneda et al., 2012). La transformation des cellules cancéreuses est également accompagnée d'une profonde modification des mécanismes de régulation épigénétique. Ainsi, certains gènes, dont la transcription était abolie dans les cellules normales, peuvent être réexprimés dans les cellules cancéreuses, et inversement. C'est le cas du gène codant pour le glypican-3, dont l'expression est éteinte dans les cancers mammaires par un mécanisme de méthylation du promoteur. De même, le promoteur du gène *HS3ST2*, qui code pour la 3-OST2, est retrouvé méthylé dans de nombreux cancers (Miyamoto et al., 2003).

Les facteurs produits dans l'environnement tumoral par les cellules cancéreuses elles-mêmes ou par les leucocytes infiltrés sont à même de modifier l'expression des protéoglycanes et la biosynthèse des GAGs. Par exemple, il a été montré que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α et IFN- γ modifient l'expression de nombreux protéoglycanes et enzyme de biosynthèse des GAGs dans des cellules endothéliales (Klein et al., 1992). Un effet identique est observé après stimulation de fibroblastes en culture par l'IL-1 β et le TGF- β (Imai et al., 1994). Cependant, les signaux intracellulaires et les mécanismes sous-jacents conduisant à la modulation d'expression de ces gènes ne sont pas encore élucidés. En revanche, nous avons vu que l'environnement des cellules cancéreuses est versatile, ce qui se traduit par une production variée en cytokines et facteurs de croissances. Par conséquent, on peut s'attendre à de profondes modifications dans l'expression des protéoglycanes et dans la structure de leurs chaînes glycaniques en fonction de la progression tumorale et du type de cancer.

Nous avons vu que les protéoglycanes, *via* leurs chaînes GAGs, modulent la fixation et l'activité d'un large panel de médiateurs solubles, comprenant des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines. Ils participent également aux processus d'adhérence et de migration cellulaire *via* les interactions qu'ils engagent avec les composants de la MEC. Par conséquent, les modifications qu'ils subissent vont impacter le phénotype prolifératif et invasif des cellules cancéreuses et contribuer à la progression tumorale (Afratis et al., 2012).

Les protéoglycanes membranaires servent de co-récepteurs pour de nombreux récepteurs de prolifération, qui ne sont activés qu'après la formation d'un complexe ternaire composé du ligand, du récepteur et de son protéoglycane associé (Afratis et al., 2012). Par exemple, le syndécan-1 et le syndécan-4 participent à la formation des complexes de signalisation FGF-2/FGFR-1 *via* des interactions engageant leurs chaînes HS (Mundhenke et al., 2002). Il a également été montré que la partie protéique du syndécan-4 module la

phosphorylation de la kinase FAK (*Focal Adhesion Kinase*), ce qui a pour effet d'augmenter la prolifération des cellules cancéreuses de mélanomes (Chalkiadaki et al., 2009). Le NG2, *via* ses chaînes CS, favorise aussi la croissance des mélanomes, *via* l'activation des kinases FAK et Erk1/2 (Yang et al., 2009). Si les protéoglycanes membranaires ont des fonctions de co-récepteurs activateurs, leurs formes solubles peuvent au contraire servir d'antagonistes. Par exemple, la présence du glypican-3 à la membrane des cellules de cancers hépatiques et de mélanomes stimule la croissance tumorale *via* la fixation des facteurs Wnt et Hedgehog. Par contre, la surexpression d'une forme soluble de ce glypican va inhiber la signalisation induite par Wnt et bloquer la croissance des cancers du foie (Zittermann et al., 2010).

L'héparanase est une endo- β -glycosidase qui clive les chaînes HS des protéoglycanes membranaires et matriciels. Par son activité ciblée, elle va libérer de nombreux facteurs de croissance liés aux chaînes HS et par conséquent, influencer la prolifération des cellules cancéreuses, l'angiogenèse au sein de la tumeur et la formation des métastases. Il a par exemple été montré que l'héparanase agit de concert avec le VEGF pour induire la prolifération cellulaire (Luan et al., 2011). Elle favorise également l'expression du HGF et le *shedding* du syndécan-1, ce qui conduit à un phénotype plus agressif des tumeurs (Ramani et al., 2011).

Par leur activité HS 6-*O*-endosulfatase, les Sulfs contrôlent négativement les activités de facteurs de croissances, tels que les FGFs. Elles sont souvent sous-exprimées dans les cancers, ce qui a pour effet de favoriser la prolifération induite par les facteurs de croissance. Par exemple, l'expression de Sulf-1 est largement diminuée voire même éteinte dans les cancers des ovaires, du sein, du pancréas et du foie (Khurana et al., 2011; Lai et al., 2003). A l'inverse, la surexpression de Sulf-2 a été corrélée à la progression des cancers du poumon (Lemjabbar-Alaoui et al., 2010; Peterson et al., 2010). De plus, elle favorise les réponses anti-apoptotiques dans les cellules de carcinomes hépatocellulaires *via* l'activation de la voie PI3K (*Phosphatidylinositol 3 Kinase*)/Akt (Lai et al., 2010). Ils semblent donc que les Sulfs puissent exercer des activités pro- ou anti-tumorales en fonction de type de cancer et des mécanismes régulés par les HS.

Les protéoglycanes jouent également un rôle important dans le potentiel invasif des cellules cancéreuses. En général, les modifications qu'ils subissent dans l'environnement tumoral réduisent l'adhérence cellulaire et favorise les processus de migration. Par exemple, le versican, largement produit par les cellules de cancer de la prostate, inhibe l'adhérence des cellules sur la fibronectine (Sakko et al., 2003). *Via* leurs chaînes GAGS, ils concentrent de nombreux facteurs pro-migratoires. Cet effet a été largement étudié pour le HGF, dont l'activité

métastatique est dépendante de la formation d'un complexe ternaire avec des chaînes HS et son récepteur de haute-affinité c-Met (Corso et al., 2005).

Les GAGs interviennent comme régulateurs de l'expression et de l'activité de nombreuses MMPs. Ainsi, l'intervention des MMP-2, -7 et -9 dans le processus d'invasion des cellules cancéreuses est dépendant de leur interactions avec les GAGs (Tocchi et al., 2013). Par exemple, l'auto-activation de la MMP-7 et l'activité protéolytique de la forme mature sont augmentées d'un facteur 50 en présence de HS hautement sulfatés, de CS-E et de DS (Ra et al., 2009). De même, l'activation de la MMP-2 par la MMP-16 membranaire est dépendante de sa fixation sur les chaînes CS-A du NG2, ce qui augmente le processus métastatique dans les mélanomes (Iida et al., 2007). Il a alors été suggéré que les GAGs pourraient agir comme régulateurs allostériques, en favorisant notamment l'activation des pro-MMPs (intra ou intermoléculaire) et/ou en servant de points d'ancrage membranaire pour localiser les MMP à proximité de leurs substrats (Tocchi et al., 2013).

Avant de coloniser un nouveau site, les cellules métastatiques doivent sortir du flux sanguin. Cette extravasation est dépendante des interactions avec les cellules endothéliales et les plaquettes. Les GAGs exprimés par les cellules tumorales participent également à cette étape critique, *via* les liaisons qu'ils engagent avec les sélectines (Monzavi-Karbassi et al., 2007).

Finalement, les modifications affectant les GAGs ont été impliquées dans les mécanismes de reconnaissance entre les cellules cancéreuses et le système immunitaire. Par exemple, il a été proposé que les récepteurs NCR (NKp30, NKp46 et NKp44) exprimés par les cellules NK reconnaissent leurs cellules cibles *via* des interactions avec des chaînes HS (Moretta et al., 2000). En effet, les cellules tumorales dépourvues de HS membranaires, invalidées pour le glypican-1 ou exprimant l'héparanase sont résistantes à l'élimination par les cellules NK, ce qui est dû à un défaut d'engagement des récepteurs NKp30 et NKp46 (Bloushtain et al., 2004). Toutefois, l'existence d'une interaction directe entre les NCR et les HS est très controversée. Selon certains auteurs, il pourrait s'agir d'un simple mécanisme de présentation, similaire à celui décrit pour les facteurs de croissance. Dans ce cas, les motifs HS reconnus par les trois NCR seraient identiques, alors que leurs « vrais » ligands pourraient être distincts. Toutefois, ces derniers sont toujours inconnus (Moretta et al., 2000). Une autre possibilité est que les cellules cancéreuses présentent des motifs HS uniques qui seraient reconnus spécifiquement par les NCR et rarement exprimés à la surface des cellules normales. Dans ce scénario, les motifs HS reconnus par les trois NCR seraient différents. De récentes données alimentent cette hypothèse, puisqu'il a été démontré que ces trois récepteurs possèdent des affinités différentes pour des motifs HS distincts (Hecht et al., 2009). Etant donné que la

structure des HS est modifiée sur les cellules cancéreuses, il est envisageable que les récepteurs NCR aient évolué pour reconnaître des motifs HS « tumoraux ». Toutefois, il a récemment été montré que la surexpression de la 3-OST4 par les cellules cancéreuses a un effet inhibiteur sur la reconnaissance par les cellules NK. Cette observation suggère que la cellule cancéreuse pourrait également modifier la structure de ses HS de façon à échapper aux cellules NK (Biroccio et al., 2013). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour élucider de manière satisfaisante leur participation dans la reconnaissance NK.

Au sein de la tumeur, les cellules cancéreuses ne sont pas les seules à dépendre des modifications de structure des GAGs. En effet, les facteurs solubles sécrétés dans la tumeur peuvent aussi agir sur les autres types cellulaires infiltrés. La majorité de ces facteurs sont régulés par les GAGs, ce qui signifie que les réponses qu'ils induisent sur les cellules infiltrées vont dépendre des modifications d'expression des protéoglycanes et de biosynthèse de leurs chaînes glycaniques (Zhang, 2010). Ainsi, les GAGs exprimés par les autres types cellulaires infiltrés dans la tumeur peuvent avoir un rôle indirect sur la croissance tumorale. C'est par exemple le cas des GAGs exprimés par les cellules endothéliales intra-tumorales. En effet, ils peuvent moduler la néovascularisation en régulant les activités du FGF-2 et du VEGF (Iozzo et al., 2001). En outre, les GAGs des cellules endothéliales présentent des motifs de fixation pour un facteur anti-angiogénique, l'endostatine (Karumanchi et al., 2001). Ces motifs diffèrent de ceux requis pour la fixation de facteurs pro-angiogéniques comme le FGF-2, ce qui suggère que les modifications structurales des GAGs peuvent rendre les cellules endothéliales plus ou moins réceptrices aux signaux pro- ou anti-angiogéniques (Sasisekharan et al., 2002). De même, la nature des GAGs portés par les leucocytes infiltrés dans les tumeurs pourraient participer à l'acquisition de leur phénotype pro- ou anti-tumoral, puisque les principales cytokines de type Th1 ou Th2, tels que l'IFN- γ et l'IL-4, sont des ligands naturels des GAGs (Lortat-Jacob et al., 1997; Saesen et al., 2013).

Objectifs du travail de thèse

Les GAGs, en raison de leur large distribution et des nombreuses fonctions qui leur sont associées, ont un rôle important dans le comportement et la destinée des cellules cancéreuses. Les interactions qu'ils engagent avec leurs différents partenaires les placent au centre de la régulation de processus physiologiques comme la différenciation, la prolifération, la survie, la migration ou encore l'adhérence cellulaire. Ainsi, qu'ils soient portés par les cellules cancéreuses elles-mêmes ou par les autres cellules infiltrées dans la tumeur, les GAGs influent sur les interactions qu'engagent ces cellules avec leur environnement et sur les réponses induites par les différents médiateurs extracellulaires présents dans la tumeur. Parmi ces facteurs, nous avons vu que l'IL-4 a un rôle prépondérant dans la polarisation de la réponse immune dans les tumeurs et qu'elle conduit en général à une inhibition des réponses anti-cancéreuses. Il a déjà été reporté que cette cytokine interagit avec les GAGs (Lortat-Jacob et al., 1997), et que ces derniers sont importants dans la modulation de son activité vis-à-vis des cellules dendritiques (den Dekker et al., 2008). Bien que de nombreuses cellules infiltrées dans les tumeurs puissent répondre à l'IL-4, les macrophages sont des cibles privilégiées et acquièrent un phénotype M2 pro-tumoral en réponse à cette molécule. Dans ce contexte, la première partie de mon travail de thèse a consisté à répondre aux questions suivantes : **Les GAGs de surface portés par les macrophages participent-ils à l'activité de l'IL-4 ? Et si tel est le cas, quelle est la nature et la structure des GAGs impliqués dans ce processus ?** Pour y répondre, plusieurs stratégies ont été utilisées, notamment l'utilisation d'inhibiteurs de biosynthèse des GAGs, d'enzymes de dégradation ou encore de siRNA ciblant les enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces molécules.

Dans un second temps, je me suis intéressé aux modifications subies par les GAGs lors de la polarisation des macrophages. En effet, l'activation M1 et M2 des macrophages s'accompagne d'une profonde réorganisation de nombreux métabolismes (Biswas et al., 2012). Cependant, celui des GAGs n'avait jamais été étudié dans ce contexte. Nous nous sommes donc posé les questions suivantes : **La polarisation des macrophages entraîne-t-elle une modification de l'expression des enzymes de biosynthèse des GAGs et, par conséquent, de la structure de ces molécules ? Et si tel est le cas, ces modifications peuvent-elles influencer sur les fonctions pro ou anti-tumorales de ces cellules ?** Pour y répondre, nous avons analysé les modifications d'expression des enzymes de maturation des GAGs suite aux deux types de polarisation, réalisé une analyse structurale des GAGs exprimés par les différents types de cellules et développé un système de coculture entre macrophages et cellules cancéreuses.

Enfin, la dernière partie de mon travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une collaboration initiée par le Dr. Sylvain Julien. Les travaux antérieurs qu'il avait réalisés, ainsi que ceux réalisés par d'autres équipes, avaient suggéré que les GAGs portés par les cellules cancéreuses pouvaient être impliqués dans la fixation de molécules d'adhérence telles que les sélectines et que ces interactions pouvaient influencer sur la formation de métastases distantes (Cooney et al., 2011; Julien et al., 2011). En effet, il est connu que la cancérisation des cellules est accompagnée par une modification de la nature des glycanes qu'elles produisent, ce qui peut conduire à l'apparition de motifs potentiellement reconnus comme des ligands des sélectines. Nous nous sommes donc intéressés à plusieurs points qui restaient en suspens : **Quel type de sélectines fixe les GAGs ? La structure des GAGs influe-t-elle sur leurs interactions avec les sélectines ? Ces interactions pourraient-elles favoriser les métastases ?** Nous avons donc quantifié les GAGs exprimés par différentes lignées cellulaires issues de cancer du sein, analysé l'expression des sulfotransférases et la fixation des sélectines recombinantes et des plaquettes sur ces différentes lignées, puis réalisé une étude de modélisation moléculaire de ces interactions.

Travaux

personnels

Chapitre 1 : Rôle des GAGs dans la polarisation M2 des macrophages induite par l'interleukine-4

I. Introduction

En présence d'IL-4 et d'IL-13, les macrophages subissent une activation alternative de type M2, ce qui leur confère des fonctions dans les processus de réparation tissulaire et de résolution de l'inflammation, dans les réactions contre les helminthes et dans les phénomènes d'allergie. Toutefois, il est important de noter que cette séparation n'est pas si tranchée *in vivo*. La désignation M2 a donc été élargie à d'autres phénotypes de macrophages. On distingue maintenant trois sous-populations : les M2a activés par l'IL-4 ou l'IL-13 ; les M2b activés par les complexes immuns en présence de ligands des TLRs ; et enfin les M2c, qui correspondent à des macrophages inactivés par les glucocorticoïdes, l'IL-10 ou le TGF- β (Gordon, 2003; Gordon et al., 2010; Martinez et al., 2008).

Les macrophages M2a se caractérisent par l'expression de nombreux marqueurs spécifiques, dont la transcription est majoritairement sous la dépendance de la voie STAT6 (Martinez et al., 2006). Ainsi, l'expression de lectines de type C, tels que DC-SIGN et MRC1 (*Mannose Receptor C-type 1*), de protéases et de facteurs de croissance, leurs confèrent une forte activité d'endocytose et de résolution de l'inflammation, ce qui est essentiel dans les processus de régénération tissulaire. Ils possèdent également des propriétés anti-inflammatoires associées à la production de TGF- β et d'IL-10 et à l'inhibition de la production de NO. Enfin, ils sécrètent des chimiokines agonistes des récepteurs CCR3, CCR4 ou CCR8, qui sont impliquées dans le recrutement d'éosinophiles, de basophiles et de lymphocytes Th2, expliquant leur implication dans les infections parasitaires et les réactions allergiques (Gordon et al., 2010). Les macrophages M2a représentent également une composante importante du microenvironnement des tumeurs. En sécrétant des facteurs impliqués dans le remodelage tissulaire et dans l'inhibition de la réponse Th1, ils participent à la mise en place d'une tolérance immunologique favorable à la survie et à la prolifération des cellules tumorales (Wang et al., 2010).

L'IL-4 humaine est une cytokine de 129 acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 18 kDa. Sa structure a été résolue par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et par diffraction des rayons X (Powers et al., 1992; Wlodawer et al., 1992). Elle est formée de quatre hélices α (A-D) arrangées en faisceau, chaque hélice étant orientée de manière antiparallèle à ses deux hélices voisines. Deux boucles relient les hélices A et B et les hélices C et D tandis qu'une boucle plus courte relie les hélices B et C. Les boucles AB et CD contiennent chacune un brin β ,

qui s'organise en feuillet au niveau de la face formée par les hélices B et D. La protéine contient 6 cystéines, impliquées dans la formation de trois ponts disulfures (C3/C127, C24/C65, C46/C99).

L'IL-4 interagit avec deux récepteurs membranaires, le premier (type I) étant majoritairement restreint aux cellules hématopoïétiques, alors que le second (type II) a une distribution plus large (Gordon et al., 2010). Les deux récepteurs ont en commun une chaîne protéique de 140 kDa appelée IL-4R α , qui fixe l'IL-4 avec une forte affinité (Kd = 20-300 pM) (Kraich et al., 2006). A cette première sous-unité réceptrice s'associe une seconde chaîne protéique. Initialement identifiée comme un composant du récepteur de l'IL-2, la chaîne γ participe à la formation du récepteur de type I de l'IL-4, mais également à celles des récepteurs des IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21. Selon le modèle établi, l'IL-4 se fixe en premier lieu à la chaîne IL-4R α , et le complexe formé recrute la sous-unité γ c pour former le récepteur fonctionnel de type I. Le récepteur de type II, quant à lui, est composé de la chaîne IL-4R α à laquelle vient s'associer la chaîne IL-13R α 1. En plus de l'IL-4, ce récepteur interagit avec l'IL-13, ce qui explique pourquoi les deux cytokines partagent des fonctions communes (Nelms et al., 1999). Des études par mutagenèse dirigée et des analyses par diffraction des rayons X ont permis d'identifier les acides aminés essentiels à l'interaction entre l'IL-4 et ses récepteurs. Ainsi, les résidus R88 et E9 de l'IL-4 sont indispensables pour l'interaction IL-4/IL-4R α , alors que les résidus R121 et Y124 sont nécessaires à l'interaction avec la chaîne γ c et la sous-unité IL-13R α 1 (Kruse et al., 1993).

Les domaines intracellulaires des récepteurs de l'IL-4 sont associés à des protéines tyrosine kinases de la famille JaK (*Janus Kinase*) : JaK1 pour la chaîne IL-4R α , JaK3 pour la chaîne γ c et TyK2 (*Tyrosine Kinase 2*) pour la chaîne l'IL-13R α 1. La liaison de l'IL-4 à ses récepteurs induit leur activation, par un mécanisme de transphosphorylation des couples JaK1/JaK3 pour le récepteur de type I, ou JaK1/TyK2 pour le récepteur de type II. Les kinases vont alors phosphoryler des résidus de tyrosine présents sur les chaînes réceptrices, ce qui va permettre le recrutement de protéines de signalisation à domaine SH2 (*Src Homology 2*) et/ou PTB (*Phosphotyrosine-Binding domain*), puis leur activation (Jiang et al., 2000). La voie majeure activée par l'IL-4 est dépendante du recrutement et de l'activation de STAT6. De manière générale, les protéines STAT sont recrutées en réponse à l'activation des récepteurs à cytokine et régulent la transcription de gènes cibles en se fixant sur des éléments de réponse présents dans leurs promoteurs. Après fixation de l'IL-4, la phosphorylation par les kinases JaK de tyrosines spécifiques sur la chaîne IL-4R α permet le recrutement de STAT6 par son domaine SH2. Les JaK vont ensuite phosphoryler STAT6 sur le résidu conservé Y641, provoquant son

homodimérisation et sa libération du récepteur. Les dimères formés migrent dans le noyau où ils vont se fixer sur des sites promoteurs, induisant la transcription de gènes-cibles de l'IL-4 (Mikita et al., 1996). Les protéines IRS (*Insulin Receptor Substrates*) sont impliquées dans l'activation de voies de signalisation associées à de nombreux récepteurs de cytokines et de facteurs de croissance. En réponse à l'IL-4, les protéines IRS-1 et IRS-2 sont recrutées *via* leur domaine PTB sur des tyrosines phosphorylées de la chaîne IL-4R α , au niveau d'un motif appelé I4R (*Insulin IL-4 Receptor Motif*). Ce motif est également retrouvé dans les récepteurs de l'insuline et de l'IGF-1, ce qui explique pourquoi la protéine IRS-1 a été initialement identifiée en réponse à ces deux ligands. Une fois liées à ce motif spécifique, les protéines IRS-1/2 sont phosphorylées à leur tour sur de nombreux résidus de tyrosine. Elles servent alors de molécules adaptatrices et vont initier le recrutement d'autres protéines de signalisation, telles que la PI3K et Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) (Sun et al., 1995). La PI3K est composée d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). La première contient deux domaines SH2 en tandem qui lui permettent d'être recrutée par IRS-1/-2. L'interaction avec ces résidus induit un changement de conformation de la PI3K qui conduit à l'activation de la sous-unité p110. Cette dernière va alors catalyser la phosphorylation de certains inositides en position 3 de l'inositol, conduisant à la production du phosphatidyl-inositol-(3,4,5)-triphosphate et du phosphatidyl-inositol-(3,4)-diphosphate (Toker et al., 1997). Ces seconds messagers sont produits très rapidement après stimulation, et induisent le recrutement de protéines sérine/thréonine-kinases, telles que Akt et plusieurs formes de PKC (PKC δ , ϵ et η) (Nelms et al., 1999). Quant à Grb2, il s'agit d'une autre protéine adaptatrice constitutivement liée à Sos, qui est un facteur d'échange GTP/GDP. Ce dernier intervient dans l'activation de la protéine G Ras et participe par conséquent à l'activation de la voie Ras/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). En réponse à l'IL-4, la liaison de Grb2 *via* son domaine SH2 aux résidus de tyrosine phosphorylés de IRS-1/-2 entraîne donc l'accumulation de Sos au niveau de la membrane, ce qui initie la cascade de phosphorylation conduisant à l'activation des kinases p44/p42 MAPK (Erk1/2) (Marais et al., 1996). Ces dernières migrent dans le noyau, où elles vont phosphoryler des protéines cibles et ainsi réguler la transcription de nombreux gènes.

Les travaux de Lortat-Jacob et al. (Lortat-Jacob et al., 1997) avaient montré que l'IL-4 se lie avec une forte affinité à l'héparine, et que cette interaction peut être déplacée en présence de HS et de CS/DS. Toutefois, peu de travaux ont porté par la suite sur le rôle physiologique de ces interactions, si ce n'est la démonstration que la différenciation des monocytes en cellules dendritiques induite *in vitro* par l'IL-4 fait intervenir des interactions avec les GAGs

membranaires (den Dekker et al., 2008). Parmi ses nombreuses activités, cette cytokine est un élément essentiel dans l'activation M2 des macrophages (Gordon et al., 2010).

Sur la base de ces données, nous avons étudié le rôle des GAGs dans la polarisation M2 des macrophages induite par l'IL-4. Nous avons ainsi mis en évidence l'implication des GAGs de surface, et notamment des chaînes glycaniques 6-*O*-sulfatés, dans l'activité pro-M2 de la cytokine. En effet, les expériences basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de biosynthèse des GAGs, d'enzymes de dégradation et d'ARN interférents ciblant des sulfotransférases, ont permis de montrer que les GAGs membranaires sont indispensables à la polarisation M2 des macrophages induite par l'IL-4. Parallèlement, nous avons entrepris la modélisation de l'interaction GAGs/IL-4 *in silico*, ce qui nous a permis d'identifier des acides aminés potentiellement impliqués dans l'interaction. Nous avons alors produit la cytokine recombinante ainsi que certains mutants modifiés par mutagenèse dirigée au niveau des acides aminés identifiés. Ces mutants seront des outils précieux pour déterminer les paramètres de la liaison entre l'IL-4 et les chaînes GAGs.

II. Partie expérimentale

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Matériel

Les cytokines recombinantes humaines IL-4, IL-13 et M-CSF proviennent de TebuBio et sont utilisées à la concentration de 10 ng/mL dans les tests de stimulation cellulaire. Le 4-méthylumbelliferyl- β -D-xylopyranoside (β -xyloside) (Sigma) est utilisé à la concentration finale de 1 mM et ajouté aux cellules 24 h avant stimulation des cellules. La chondroïtinase ABC (Sigma) (0,3 U pour 10^6 cellules et les héparinases I, II et III (Iduron) (0,1/0,2/0,2 mU pour 10^6 cellules) sont incubées avec les cellules pendant 2 h à 37°C avant stimulation. Les oligosaccharides d'héparine et de CS bovins (45 % CS-A, 55 % CS-C) sont préparés au Laboratoire par hydrolyse ménagée et fractionnement en fonction de leur taille par gel-filtration. A l'exception des cytokines fournies sous forme *endotoxin-free*, tous les composés ont été décontaminés sur Detoxi-gel (Pierce). L'absence d'endotoxine a été vérifiée par le test Limulus (BioWhittaker) et par dosage ELISA du TNF- α produit dans les surnageants de macrophages stimulés pendant 6 h. Les anticorps anti-HS (RB4Ea12), anti-CS (IO3H10) et contrôle négatif (MPB49) ont été fournis par T. Van Kuppevelt (Université de Nijmegen). Ces anticorps ont été produits par la technologie du phage display et sont étiquetés avec un fragment de la protéine de capsid du VSV. Ils ont été utilisés à la dilution de 1/200 (Deligny et al., 2010). Les anticorps commerciaux utilisés sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Anticorps utilisés en immunorévélation et en cytofluorimétrie en flux

| Anticorps primaire | Référence | Origine | Dilution |
|----------------------------------|----------------|----------------------|----------|
| Anti-phospho-STAT6 (Tyr641) | Cell Signaling | Polyclonal de Lapin | 1/2000 |
| Anti-GAPDH | Sigma | Polyclonal de Souris | 1/2000 |
| Anti-VSV | Sigma | Polyclonal de Souris | 1/1000 |
| Anti-MRC1 | BD Biosciences | Polyclonal de Souris | 1/1000 |
| Anti-DC-SIGN | BD Biosciences | Polyclonal de Souris | 1/1000 |
| Anticorps secondaire | Référence | Origine | Dilution |
| Anti-Ig de Lapin - peroxydase | Amersham | | 1/40000 |
| Anti-Ig de Souris - peroxydase | Amersham | | 1/10000 |
| Anti-Ig de Souris - fluorescéine | Sigma | | 1/64 |

2.1.2. Isolement des monocytes du sang et polarisation M2 in vitro

Les monocytes sont isolés à partir d'échantillons de sang total provenant de l'Etablissement Français du Sang (Lille). Le sang dilué dans du tampon PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (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 mononucléées sont récupérées puis lavées par du PBS. Les monocytes sont isolés par sélection positive en présence de billes magnétiques Imag (Becton Dickinson) conjuguées aux anticorps anti-CD14 ($200 \cdot 10^6$ cellules/mL). Après 30 min d'incubation à température ambiante, la suspension cellulaire diluée à $50 \cdot 10^6$ cellules/mL est mise en contact avec l'aimant BD IMagnet. Après deux lavages, les cellules CD14⁺ sont recueillies et leur pureté est estimée par cytofluorimétrie en flux (>95%). La différenciation des monocytes en macrophages est réalisée en présence de M-CSF (10 ng/mL) ($1 \cdot 10^6$ cellules/mL) pendant 5 jours dans du milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL) additionné de 2 mM de L-glutamine et 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité relative. Afin d'obtenir un phénotype M2, les macrophages sont ensuite incubés en présence d'IL-4 et/ou d'IL-13 (10 ng/mL) pendant 16, 24 ou 36 h supplémentaires selon les expériences.

2.1.3. Détection des protéines par immunorévélation

L'activation de la voie JaK/STAT est analysée en stimulant les cellules ($1 \cdot 10^6$ cellules/point) en présence de 10 ng/mL d'IL-4 pendant 1 à 30 min. Aux temps indiqués, les cellules sont lavées avec du PBS froid contenant des inhibiteurs de phosphatases (orthovanadate de sodium 1 mM, NaF 10 mM). Les cellules sont ensuite lysées par 75 µL de tampon hypertonique (Hepes 20 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,5 M, glycérol 25%, Triton X-100 1%) additionné d'inhibiteurs de protéases (Roche) et de phosphatases pendant 3 h à 4°C. Les lysats sont clarifiés par centrifugation, complétés par le tampon de Laemmli 3X, puis déposés sur gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*) à 10 %. La migration est réalisée pendant une nuit à 50 V dans un tampon Tris 16,5 mM, glycine 125 mM,

SDS 1%, pH 8,8. L'électrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose est réalisé pendant 3 h à 4°C à 250 mA. La membrane est ensuite saturée avec une solution de TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) - Tween 20, 0,1% - lait 5 %, pendant 2 h à température ambiante. L'incubation de l'anticorps primaire est réalisée dans une solution de TBS - Tween 20, 0,1 % - lait 5 %, durant une nuit à 4°C. Après lavage, les anticorps secondaires couplés à la peroxydase sont ajoutés pendant 1 h à 20°C. La détection est réalisée avec le kit ECL Advance (Amersham Biosciences).

2.1.4. Analyse et quantification de l'expression des ARNm par RT-qPCR

Les ARN totaux sont extraits à partir de 1.10^6 cellules à l'aide du kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel). La réaction de rétrotranscription est réalisée avec 2 µg d'ARN totaux en utilisant le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR (Thermo Scientific), selon les instructions des fabricants. Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées à l'aide d'un système Mx4000 Multiplex Quantitative PCR (Stratagène). Chaque milieu réactionnel, réalisé en triplicate, contient 2 µL d'ADNc (dilué au 1/4), 12,5 µL de Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (2X) (Stratagène), 8,5 µL d'H₂O et 1 µL de chaque amorce (Tableau 2). Le protocole d'amplification, répété 40 fois, est composé des étapes suivantes : 30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'hybridation des amorces à la température spécifique, et 30 s d'élongation à 72°C. Les données de fluorescence sont enregistrées après l'étape d'élongation. L'amplification spécifique est contrôlée par génération de la courbe de dissociation. Pour chaque couple d'amorces, l'efficacité est déterminée par amplification de dilutions sériées d'un même produit de rétrotranscription. L'HPRT (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase*) est utilisée comme témoin interne pour normaliser les résultats. La quantification relative de l'expression des gènes est déterminée selon la méthode décrite par (Pfaffl, 2001).

Tableau 2 : Séquences des amorces et conditions utilisées en QPCR

| ADNc cible | Séquence des amorces sens (S) et anti-sens (AS) | Produit de PCR | Température d'hybridation | Concentration finale |
|-----------------------|---|----------------|---------------------------|----------------------|
| Marqueurs M2 | | | | |
| CCL22 | S: 5'-ATGGATCGCCTACAGACTGCACTC-3' AS: 5'-CACGGCAGCAGACGCTGTCTTCCA-3' | 114 pb | 53°C | 600 nM 600 nM |
| FN1 | S 5'-TGACACTTATGAGCGTCCT-3' AS 5'-AAACACTTCTCAGCTATGGG-3' | 233 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| CTSC | S 5'-GCGCGATGTCAACTGCTCGG-3' AS 5'-CCAACGTCTGTTTCATGGCCAGTTTG-3' | 273 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| HRH1 | S 5'-GCTGGGCTACATCAACTCCAC-3' AS 5'-CCCTTAGGAGCGAATATGCAGAA-3' | 102 pb | 53°C | 600 nM 600 nM |
| Gène référence | | | | |
| HPRT | S: 5'-GCCCTGGCGTCGTGATT-3' AS : 5'-CTCAGCATAATGATTAGGTATGCAAA-3' | 104 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |

Tableau 2 (suite) : Séquences des amorces et conditions utilisées en QPCR

| Sulfotransférases (HS) | | | | |
|-------------------------------|--|--------|------|------------------|
| NDST1 | S: 5'-ACCACAGCCAGACTGAACGTTTTGTG-3' AS: 5'-ACAGGGAAATGTCCAGTCTGTCTCC-3' | 443 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| NDST2 | S: 5'-ACTGAGTCCCGTCTTTTCTT-3' AS: 5'-AGGATACCCCTTCCCTTCTCA-3' | 285 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| NDST3 | S: 5'-TTTCCCCCATTTTCAGTTGC-3' AS: 5'-ATGTCCTGCTATCAGAATCCATTG-3' | 239 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| NDST4 | S: 5'-CAGTCCACATAGAAAGATGGCTAA-3' AS: 5'-AACGAGGTGTAACCTCCAGAAA-3' | 132 pb | 67°C | 300 nM 900 nM |
| HS2ST1 | S: 5'-CGAAGTCCGAGAAATTGAGC-3' AS: 5'-AATGAAGTGCTTGCCGTTTT-3' | 123 pb | 60°C | 300 nM 300 nM |
| HS3ST1 | S: 5'-TTATCTCCTCGGCGATTCCTTG-3' AS: 5'-TAGCCAGTCACTAACTGCTTCTCCAT-3' | 117 pb | 67°C | 900 nM 600 nM |
| HS3ST2 | S: 5'-GAATAAGCCCACGAAAGGAAA-3' AS: 5'-TATGGGCAGAAAGGAGAATGA-3' | 272 pb | 60°C | 900 nM 600 nM |
| HS3ST3A1 | S: 5'-CAGTGCCTCTCCACCTC-3' AS: 5'-GCCAGGCAGTAGAAGACGTAA-3' | 108 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| HS3ST3B1 | S: 5'-CTGGCTTCAGGCAAGGAGAT-3' AS: 5'-GACCCACTGAAAAAGCTGGA-3' | 104 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| HS3ST4 | S: 5'-GACTCATCCTCGCATTGACCCA-3' AS: 5'-TCATTTATCACCTCTTCTGTTCC-3' | 127 pb | 67°C | 300 nM 600 nM |
| HS3ST5 | S: 5'-TGGGAGCTTGGATAGGCTACA-3' AS: 5'-TGGAGGCGAACCTGCTCC-3' | 159 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| HS3ST6 | S: 5'-CAAGGGCTTCCCCTGCCTCAAG-3' AS: 5'-AGCATCCCCAGGGTGCCGCTCA-3' | 200 pb | 68°C | 600 nM 900 nM |
| HS6ST1 | S: 5'-GGCCCTTCATGCAGTACAAT-3' AS: 5'-TACAGCTGCATGTCCAGGT-3' | 102 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| HS6ST2 | S: 5'-CCCTGGTAGGCTGTACAAC-3' AS: 5'-AAACTCAGTGAGGCCGAAGA-3' | 105 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| HS6ST3 | S: 5'-CATCTCCCCCTTACACAGT-3' AS: 5'-CTCGTAAAGCTGCATGTCCA-3' | 111 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| Sulfotransférases (CS) | | | | |
| D4ST1 (CHST14) | S: 5'-ATTCCCCGAGTTCCTGAGAT-3' AS: 5'-CAGCCTCCAGCCTCATAG-3' | 137 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| C4ST1 (CHST11) | S: 5'-ATCAACCACCGCTTGAAAAG-3' AS: 5'-TTGATGATCTTGGTGCCGTA-3' | 140 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| C4ST2 (CHST12) | S: 5'-GTGTCCTTCGCCAACTTCAT-3' AS: 5'-TTCCCCACGAAGTCGTAGTC-3' | 131 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| C4ST3 (CHST13) | S: 5'-ATCGGGTCTCCTCTCCTC-3' AS: 5'-TAAAACCTGTGACCGCATTG-3' | 131 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| UST | S: 5'-GCAAAGCTGAACGTGAATGA-3' AS: 5'-TTCCAAGCTTCTGTGCTCT-3' | 148 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| C6ST1 (CHST3) | S: 5'-ACGCCCTTTTCTTGGTTTTT-3' AS: 5'-AGAGCTTGGGAATCTGCTT-3' | 106 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| C6ST2 (CHST7) | S: 5'-GGGGCAATCTGTCACTCT-3' AS: 5'-AGGATGCCTTGTGAAATGG-3' | 136 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |
| CHST15 | S: 5'-TGAGTTCACGACCAGACAGC-3' AS: 5'-CGTACCAACAGGGGCTCTTA-3' | 116 pb | 60°C | 600 nM 600 nM |

2.1.5. Cytofluorimétrie en flux

L'expression membranaire de DC-SIGN et de MRC1 est analysée en incubant les cellules (1.10^6 cellules/mL) avec les anticorps correspondants dans 250 μ L de PBS-BSA 0,5% pendant 1 h à 4°C. Après lavages, les anticorps secondaires couplés à la fluorescéine sont ajoutés pendant 1h supplémentaire à 4°C. La fixation non spécifique est déterminée en présence d'un anticorps isotype contrôle. Les cellules sont analysées immédiatement après un dernier lavage. La présence des HS et des CS à la surface cellulaire est analysée en incubant les cellules (1.10^6 cellules/mL) en présence des anticorps RB4Ea12 (anti-HS), IO3H10 (anti-CS) ou MPB49 (témoin négatif)

dans 250 μ L de tampon PBS contenant 0,5% de BSA pendant 1 h à 4°C. Après lavages, un anticorps anti-VSV est ajouté pendant 1 h à 4°C, puis les complexes sont révélés par un anticorps anti-IgG de souris couplé à la fluorescéine. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois et analysées immédiatement. L'acquisition et l'analyse des données sont réalisées avec un cytofluorimètre en flux FACScalibur (Becton Dickinson) et le logiciel CellQuest.

2.1.6. Invalidation de gènes par ARN interférence

Les duplexes siRNA (*small-interfering RNA*) ciblant les transcrits des NDST1, HS6ST1, C6ST2, CHST15, UST (Sigma) et de la HS2ST (Eurogentec) sont présentés dans le Tableau 3. Un siRNA contrôle (Mission®, Sigma) a été utilisé comme témoin négatif. L'incorporation des siRNA dans les cellules est réalisée en présence d'INTERFERin® (Polyplus Transfection). Les complexes siRNA/INTERFERin® sont réalisés en mélangeant 60 pmol de chaque duplexe de siRNA dans 400 μ L de RPMI 0% SVF (Serum de Veau Fœtal) à 20 μ L d'INTERFERin® pendant 15 min à température ambiante. La transfection est ensuite réalisée en transférant 400 μ L du mélange siRNA/INTERFERin à 3 millions de macrophages dans 2 mL de milieu RPMI 10% SVF (concentration finale de chaque siRNA : 50 nM). Après 4 à 6 h d'incubation à 37°C, les cellules sont reprises dans 4 mL de milieu RPMI 10 % SVF additionné de M-CSF.

Tableau 3 : Séquence des duplexes siRNA utilisés

| ARNm cible | Séquence | Position | N° d'accension |
|------------|-------------------------------------|----------|----------------|
| NDST1 | S: 5'-CCUCCGACUUCUACUUUGA-dT-dT-3' | 2508 | NM_001543.4 |
| HS6ST1 | S: 5'-GACAUGCAGCUGUACGACU-dT-dT-3' | 1064 | NM_004807.2 |
| | S: 5'-GUGUGUCCUCACCAACUA-dT-dT-3' | 1636 | |
| | S: 5'-CUGUUCGAGCGGACGUUCA-dT-dT-3' | 941 | |
| HS2ST1 | S: 5'-GCGCUUUGUAAAGAAUAUA-dT-dT-3' | 749 | NM_012262.3 |
| C6ST2 | S: 5'-GCAAUUCUGCUGAGCAGGA-dT-dT-3' | 1858 | NM_019886.3 |
| | S: 5'-GACGCAUUGGUUGAGAUGA-dT-dT-3' | 1903 | |
| | S: 5'-GAACCAGUCUCCUCGGUUC-dT-dT-3' | 482 | |
| CHST15 | S: 5'-GGGAUUUCUACAGGCCUUU-dT-dT-3' | 2223 | NM_015892.4 |
| | S: 5'-CUUUGCAAGUUCGAAUAAA-dT-dT-3' | 1825 | |
| | S: 5'-GGACUAUCCAAGCAUAAA-dT-dT-3' | 1054 | |
| UST | S: 5'-CCUAAUUUAUUCACUCGACA-dT-dT-3' | 781 | NM_005715.2 |
| | S: 5'-CAAUGAGUGUAUUCUUGAA-dT-dT-3' | 983 | |
| | S: 5'-GAGAUACGAGUACGAGUUU-dT-dT-3' | 1319 | |

2.1.7. Modélisation moléculaire

Les fichiers utilisés pour la modélisation ont été téléchargés sur la RCSB. La structure de l'IL-4 provient du fichier 1HIK, alors que les différents hexamères de GAGs ont été déduits à partir de la structure du dodécasaccharide d'héparine (1HPN). Les oligosaccharides adoptent une structure hélicoïdale droite et un disaccharide d'héparine typique mesure entre 8 et 8.7 Å. Contrairement à ce qui est généralement observé en chimie pharmaceutique, où les petites molécules se fixent dans des sillons de la protéine, les interactions entre les GAGs sulfatés et

les protéines prennent place à la surface de la protéine. En raison d'une flexibilité possible des GAGs, la localisation de la région d'interaction protéique doit être déterminée avec attention. De ce fait, nous avons décidé d'utiliser une procédure en deux étapes associant des expériences de docking rigides et flexibles successives. Les expériences de docking rigides ont été réalisées en utilisant les logiciels GRAMM (*Global RAnge Molecular Matching*), ESCHER, BiGGER et HEX. Parmi les différentes solutions proposées, une zone contenant les résidus K61, K77, R81, K84, R85 et R88 de l'IL-4 a été retenue en raison d'un consensus dans les résultats. Lors de la deuxième étape, la zone définie au préalable a été utilisée pour des expériences de docking flexible en utilisant le programme GOLD. Un site de fixation sphérique d'un rayon de 15 Å centré sur l'atome CA du résidu R85 a été utilisé. Les chaînes latérales des acides aminés (K61 à R88) situés dans la zone de liaison ont été définies comme flexibles, alors que les oligosaccharides ont été gardés partiellement rigides à l'exception des résidus d'IdoUA. La rigidité relative du ligand a été estimée en utilisant des simulations de dynamique moléculaire NVT de 1 ns dans une boîte à eau TIP4P. Ensuite, la conformation tridimensionnelle des complexes obtenus a été affinée par minimisation de l'énergie avec les chaînes latérales des acides aminés dans le site de liaison. Ce calcul final permet de prédire la meilleure conformation des oligosaccharides pour l'interaction en prenant en compte la flexibilité des résidus d'IdoUA. Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec le champ de force spectroscopique « SPASIBA », développé dans notre groupe et introduit dans le programme CHARMM.

Afin de classer les complexes obtenus en fonction de leurs valeurs énergétiques, nous avons choisi de calculer l'énergie potentielle d'interaction de chaque complexe, qui peut être déterminée en utilisant la formule suivante : $E_{\text{interaction}} = E_{\text{complexe}} - E_{\text{protéine}} + E_{\text{ligand}}$. Les valeurs énergétiques ont été calculées en utilisant le champ de force MMFF94, qui est approprié pour la minimisation énergétique de ces complexes. Finalement, nous avons énuméré à l'aide du logiciel Discovery Studio 4.0 les liaisons hydrogènes entre les chaînes GAGs et les acides aminés dans les dix modèles générés pour chaque type d'oligosaccharides. Ces données ont ensuite été compilées et nous ont permis de déterminer les zones impliquées dans la fixation entre l'IL-4 et les GAGs et d'identifier les résidus d'acides aminés impliqués.

2.1.8. Construction des vecteurs d'expression

La séquence codante pour l'IL-4 mature a été clonée par PCR à partir d'ADNc provenant de lymphocytes T isolés de sang humain. Pour cela, des amorces contenant des sites de restriction ont été élaborées : S : 5'-GGCCGCATATGCACAAGTGCGATATCA CCT-3' (le site de restriction pour NdeI est souligné) et AS : 5'-CGCGGATCCTCAGCTC

GAACACTTTGAATATTTCT-3' (le site de restriction pour BamHI est souligné). Le mélange réactionnel de PCR (50 µL) est composé de tampon DyNAzyme EXT 1x (50 mM Tris-HCl (pH 9), 1,5 mM MgCl₂, 15 mM (NH₄)₂SO₄ et 0,1% Triton X-100), 200 µM de chaque dNTP, 0,2 µM des amorces sens et anti-sens, environ 10 ng d'ADNc et 1U de DyNAzyme EXT DNA polymérase. Les conditions de PCR incluent une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 5 min, suivie de 30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30s, une étape d'hybridation à 60°C pendant 1 min, une élongation à 72°C pendant 1 min, suivie d'une étape finale d'élongation à 72°C pour 5 min.

Le plasmide pET15b (Novagen) contient un promoteur inductible de l'ARN polymérase T7, une séquence codante pour un site de coupure par la thrombine ainsi qu'une séquence codante pour une étiquette 6xHis en 3' du site multiple de clonage. Ce plasmide permet d'exprimer une protéine étiquetée poly-His en Nt pouvant être purifiée par affinité sur colonne de nickel et libérée de l'étiquette par action de la thrombine après purification. Après la réaction de PCR, l'amplicon de 400 pb a subi une double digestion enzymatique avec les enzymes de restriction NdeI et BamHI (Biolabs). En parallèle, le plasmide pET15b a été linéarisé par coupure avec les mêmes enzymes de restriction. Après ligation avec la T4 DNA ligase (Invitrogen) et transformation des bactéries *E.coli* TOP10 compétentes, la sélection des clones a été réalisée sur ampicilline (100µg/ml). L'ADN plasmidique a été purifié à partir des clones résistants et envoyé en séquençage chez GATC-Biotech.

A partir de cette première construction, des mutants de l'IL-4 ont été générés par mutagenèse dirigée en utilisant le kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). Pour le mutant IL-4-RRR, les résidus R81, R85 et R88 ont été substitués par des résidus d'alanine en utilisant le couple d'amorce suivant : 5'- CAAGCAGCTGATCGCA TTCCTGAAAGCGCTCGACGCGAACCTCTGGGGC-3' (les trois codons modifiés sont soulignés). Le second mutant IL-4-K61A correspond à la mutation du résidu K61 à l'aide du couple d'amorces suivant : S : 5'- CTACAGCCACCATGAGGCGGACACTCGCTGCCTG-3' (le codon modifié est souligné). Enfin, le mutant IL-4-K77A a été muté sur le résidu K77 à l'aide du couple d'amorces suivant : S : 5'- GCAGTTCCACAGGCACGCGCAGCTGATCC GATTC-3' (le codon modifié est souligné).

Le vecteur pET151/D-TOPO (Champion pET151 Directional TOPO Expression Kit, Invitrogen) a également été utilisé pour optimiser l'expression de l'IL-4 recombinante. Des PCR ont été réalisées à partir des différents vecteurs d'expression dérivés du pET15b (IL-4WT, IL-4-RRR ...) avec un couple d'amorces spécifiques (S : 5'-CACCCACAAGTGCGA TATCACCT-3' ; AS : 5'-TCAGCTCGAACACTTTGAATATTTCT-3'). L'amorce sens a été

dessinée de façon à ajouter quatre bases (CACC) nécessaire à l'insertion directionnelle dans le vecteur pET151/D-TOPO. Le mélange réactionnel de PCR (50µL) est composé du tampon AccuPrime Pfx 1x contenant 1 mM de MgCl₂ et 300 µM de chaque dNTP, 0,3 µM des amorces sens et anti-sens, 10 ng d'ADNc et 1U d'AccuPrime Pfx DNA polymérase. Les conditions de PCR incluent une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 2 min, suivie de 30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 s, d'hybridation à 50°C pendant 30 s et d'élongation à 68°C pendant 1 min, suivie d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 2 min. Après ligation et transformation des bactéries *E. coli* TOP10 OneShot, la sélection a été réalisée sur ampicilline (100 µg/mL). L'intégrité des constructions a été vérifiée par séquençage (GATC-Biotech).

2.1.9. Production et purification de l'IL-4 recombinante

La production de l'IL-4 recombinante et de ses formes mutées a tout d'abord été testée dans la souche *E.coli* Origami (DE3), puis les essais ont été poursuivis avec la souche Rosetta-gami B (DE3). Dans les deux cas, les transformations ont été réalisées avec les vecteurs construits à partir du plasmide pET15b ou du pET151/D-TOPO. La souche Origami B (DE3) contient une mutation dans le gène codant pour la perméase au lactose (LacY), ce qui permet une entrée uniforme de l'IPTG dans les cellules et améliore ainsi l'induction de l'expression du gène d'intérêt. Elle possède aussi deux mutations dans les gènes codant pour la thiorédoxine réductase et la glutathion réductase, qui améliorent considérablement la formation des ponts disulfures dans le cytoplasme des bactéries. La souche Rosetta-gami B (DE3), quant à elle, possède les mêmes caractéristiques que la souche Origami B, si ce n'est qu'elle possède en plus le plasmide pRARE, qui code pour 7 ARNt eucaryotes et permet d'augmenter le rendement de production des protéines recombinantes.

La production de protéines recombinantes est initiée en inoculant une colonie bactérienne dans 5mL de milieu LB contenant soit 34 µg/mL de chloramphénicol, 12,5 µg/mL de tétracycline et 100 µg/mL d'ampicilline dans le cas de la souche Rosetta-gami B (DE3), soit 15 µg/mL de kanamycine, 12,5 µg/mL de tétracycline et 100 µg/mL d'ampicilline dans le cas de la souche Origami B (DE3). Les cultures sont réalisées pendant 5 h à 37°C sous agitation (230 rpm). Les suspensions bactériennes sont ensuite utilisées pour ensemer 100 mL de milieu LB contenant les mêmes antibiotiques. La culture est réalisée pendant une nuit à 37°C sous agitation. Finalement, ces échantillons sont dilués 20 fois avec les mêmes milieux de culture, et l'incubation est poursuivie jusqu'à atteindre une absorbance de 0,8 à 600nm. L'expression de la protéine recombinante est induite par addition de 1 mM d'IPTG pendant 4h à 22°C. Les cellules sont récupérées par centrifugation (3500g, 20 min, 4°C), lavées deux fois

par du PBS, puis les culots bactériens (3-4g par litre de culture) sont conservés pour l'étape de purification.

Les culots bactériens sont repris dans un tampon de lyse (50 mM NaH₂PO₄-2H₂O (pH8), 300 mM NaCl, 10 mM imidazole), à raison de 30 ml par litre de culture bactérienne d'origine. Après trois cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide, la suspension est soumise à une sonication (4 x 3min, pulse 40%), puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 1 h à 10000g à 4°C. La purification est ensuite réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA adaptée sur un système AKTA-purifier (GE Healthcare). Le surnageant est chargé sur la colonne préalablement équilibrée avec le tampon de lyse. Après lavage de la colonne avec un tampon phosphate 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM, pH 8, l'élution de la protéine est réalisée par un gradient d'imidazole variant de 20 mM à 250 mM. Après vérification de la présence d'IL-4 par SDS-PAGE, les fractions d'intérêt sont rassemblées, concentrées (Amicon Ultra centrifugal filter unit, Millipore), puis dialysées contre un tampon PBS.

2.1.10. Analyses statistiques

Les résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences distinctes réalisées avec des monocytes extraits d'échantillons de sang de donneurs différents. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le Student t-test. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

III. Résultats

3.1. Caractérisation des marqueurs de l'activation M2 des macrophages

L'activation M2 des macrophages induit l'apparition d'un phénotype spécifique, qui est suivi par l'expression de nombreux marqueurs membranaires ou sécrétés. Afin de valider notre modèle d'étude, nous avons vérifié si l'IL-4 est suffisante pour induire l'expression des marqueurs M2 dans les macrophages dérivés des monocytes *in vitro*. Pour cette étude, les macrophages ont été stimulés par l'IL-4, l'IL-13 ou la combinaison des deux cytokines, et nous avons comparé les niveaux d'expression membranaire des récepteurs DC-SIGN et MRC-1, ainsi que la production de la chimiokine CCL22, de la fibronectine-1 (FN1), de la cathepsine C (CTSC) et du récepteur H1 de l'histamine (HRH1) (Figure 16A).

DC-SIGN et MRC1 sont des lectines membranaires impliquées notamment dans la reconnaissance et l'endocytose de molécules dérivés de divers microorganismes. Comme décrit dans la littérature, nous avons vérifié que la combinaison IL-4/IL-13 induit une forte expression de ces deux marqueurs après 36 h de stimulation des macrophages. L'IL-4 seule est aussi efficace, puisque le niveau d'expression est similaire à celui observé en présence de la combinaison IL-4/IL-13. En revanche, la stimulation des macrophages par l'IL-13 seule est moins efficace, ce qui indique que les deux cytokines se différencient au niveau de l'intensité des signaux. Ces résultats ne sont toutefois pas surprenants, puisque les macrophages expriment les deux récepteurs dimériques IL-4R α / γ c et IL-4R α /IL-13R α 1. Contrairement à l'IL-13 dont l'activité est restreinte à son interaction avec le récepteur IL-4R α /IL-13R α 1, l'IL-4 interagit avec les deux récepteurs. Ainsi, elle est à même de pallier l'absence de l'IL-13 en générant des signaux complémentaires *via* la fixation sur les deux récepteurs.

Pour compléter cette étude, nous avons analysé l'expression de 4 autres marqueurs de l'activation M2 par PCR en temps réel (Figure 16B). Nous avons choisi ces protéines car ce sont des marqueurs fonctionnels des macrophages M2 : CCL22 est reconnue par le récepteur CCR4 et intervient principalement dans le recrutement des lymphocytes Th2 et Treg ; FN-1 est un constituant des matrices extracellulaires et participe au remodelage tissulaire ; CTSC est une protéase à cystéine également impliquée dans le remodelage tissulaire *via* notamment l'activation d'autres protéases matricielles ; enfin, HRH1 (*Histamine H1 Receptor*) est un récepteur impliqué dans la réponse immune de type 2. Comme attendu, l'expression des transcrits de chaque protéine est nettement augmentée après incubation en présence d'IL-4. L'addition d'IL-13 ne modifie pas de façon significative le taux de chaque transcrit, ce qui confirme que l'IL-4 est suffisante pour induire un phénotype M2 *in vitro*.

3.2. Rôle des GAGs membranaires dans l'activité de l'IL-4

Sur la base de ces premiers résultats, nous nous sommes intéressés au rôle des GAGs membranaires dans les réponses cellulaires induites par l'IL-4. Pour cette étude, les GAGs membranaires ont été éliminés soit en bloquant leur biosynthèse par un traitement au β -xyloside, soit de manière sélective en traitant les macrophages par la chondroïtinase ABC ou par un cocktail d'héparinases I, II et III. Le β -xyloside bloque la première étape de transfert du résidu de xylose sur le core protéique des protéoglycanes, et inhibe l'expression des HS et des CS/DS à la surface des cellules.

Afin de s'assurer de l'efficacité de ces traitements, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre les deux familles de GAGs et analysé leur fixation sur les macrophages traités ou

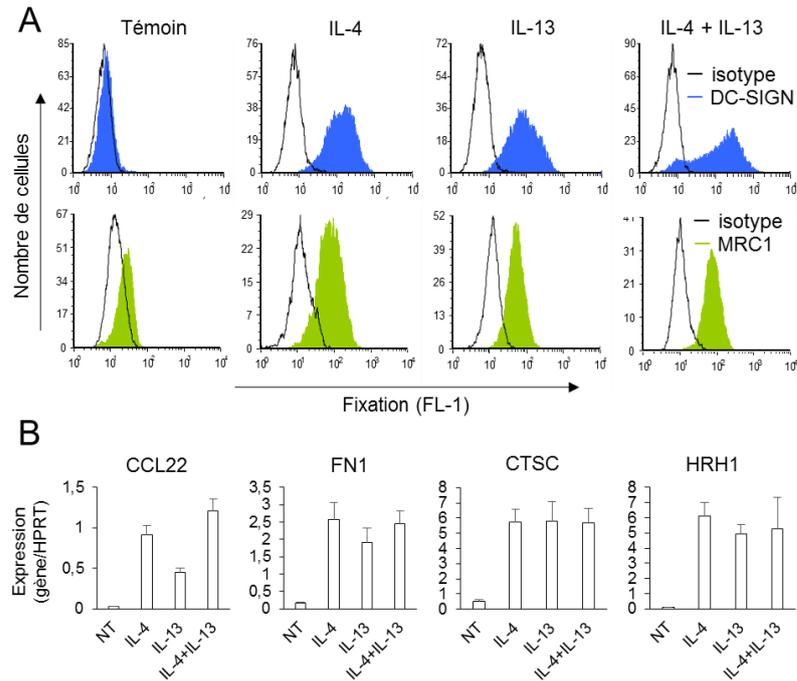


Figure 16 : Expression des marqueurs M2 induits par stimulation des macrophages dérivés des monocytes du sang. (A) L'expression membranaire de DC-SIGN (bleu) et de MRC1 (vert) a été analysée par cytofluorimétrie en flux après 36 h de stimulation par l'IL-4 (10 ng/ml), l'IL-13 (10 ng/ml) ou par les deux cytokines ajoutées simultanément. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences distinctes. (B) L'expression des ARNm de CCL22, FN1, CTSC et HRH1 a été analysée par PCR en temps réel après 24 h de stimulation par l'IL-4 (10 ng/ml), l'IL-13 (10ng/ml) ou les deux. L'expression du transcrit de l'HPRT a été utilisée pour normaliser les données. Les valeurs sont des moyennes \pm SD de trois expériences distinctes.

non. Ces anticorps, synthétisés par l'équipe de T. Van Kuppevelt (Nijmegen) grâce à la technologie de phage-display, reconnaissent certains motifs présents dans les HS et les CS. Le premier, nommé RB4eA12, reconnaît spécifiquement les HS et plus particulièrement les motifs *N*- et 6-*O*-sulfatés, retrouvés principalement dans les zones de transition NA/NS. Quant au second, nommé IO3H10, il reconnaît spécifiquement les CS. Le traitement des macrophages par la chondroitinase ABC réduit la fixation de l'anticorps IO3H10 d'environ 80% et n'a pas d'influence sur la fixation de RB4eA12, indiquant que le traitement a été efficace et qu'il n'y a pas de réaction croisée. Les héparinases éliminent spécifiquement et efficacement les HS, comme en témoigne la fixation réduite de l'anticorps RB4eA12 sur les macrophages traités.

Enfin, la fixation des deux anticorps est réduite sur les mêmes cellules après traitement par le β -xyloside, confirmant l'efficacité de ce composé à inhiber la biosynthèse des deux types de GAGs (Figure 17).

Les macrophages traités ou non ont alors été stimulés par l'IL-4 pendant 36 h, puis l'expression des marqueurs M2 a été analysée par cytofluorimétrie en flux (DC-SIGN et MRC1) et PCR en temps réel (CCL22, HRH1, FN1, CTSC). Le niveau de transcription de CCL22, HRH1 et FN1 est réduit d'au moins 50 % après traitement des macrophages par le β -xyloside, la

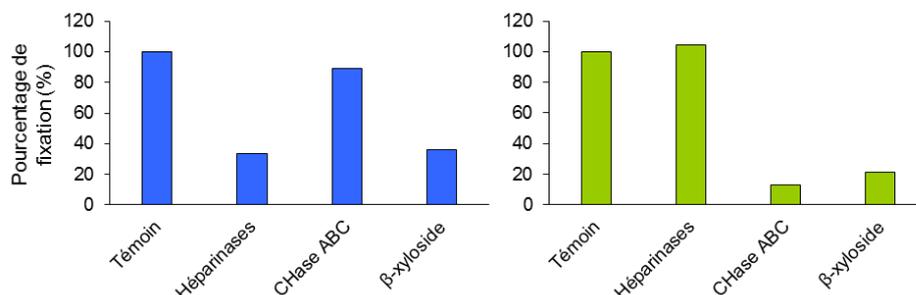


Figure 17 : Efficacité des traitements d'élimination des GAGs membranaires. L'expression des GAGs à la surface des macrophages a été estimée par fixation des anticorps anti-HS (RB4Ea12) et anti-CS (IO3H10) en cytofluorimétrie en flux. Les macrophages ont été soit incubés pendant 2 h en présence de chondroïtinase ABC (CHase ABC) ou d'un mélange d'héparinases I, II, III (Héparinases), soit traités pendant 24 h en présence de β -xyloside. Après lavage, l'efficacité des traitements a été estimée en analysant la fixation des anticorps anti-GAGs. Les données, exprimées en pourcentages de fixation par rapport aux cellules non traitées, correspondent aux résultats obtenus lors d'une expérience et sont représentatives de trois expériences indépendantes.

chondroïtinase ABC ou les héparinases. L'expression du dernier marqueur (CTSC) est également réduite, mais seulement d'environ 25%, ce qui pourrait être lié à son expression qui est déjà élevée en absence d'IL-4 (Figure 18A). Après traitement par le β -xyloside, l'expression membranaire DC-SIGN et de MRC1 est respectivement diminuée de 73 ± 12 et de 73 ± 6 % par rapport aux cellules non traitées, ce qui confirme l'implication des GAGs dans les réponses induites par l'IL-4. Les traitements enzymatiques réduisent également de façon significative l'expression des deux marqueurs : chondroïtinase ABC : 78 ± 11 % pour DC-SIGN et 65 ± 9 % pour MRC1 ; héparinases : 68 ± 16 % pour DC-SIGN et 68 ± 9 % pour MRC1 (Figure 18B et 18C). Ces résultats montrent que les GAGs membranaires, de type CS et HS, sont impliqués dans les réponses induites par la fixation de l'IL-4 sur les macrophages.

3.3. Invalidation des sulfotransférases

Après avoir démontré le rôle des GAGs membranaires dans l'activité de l'IL-4, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux motifs de sulfatation nécessaires à la fixation de l'IL-4 sur les GAGs et à son activité. Pour cela, nous avons opté pour une stratégie consistant à inhiber différentes sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse des HS et des CS et d'analyser les réponses induites par l'IL-4 dans les macrophages invalidés. Afin de déterminer les enzymes à invalider, nous avons dans un premier temps analysé l'expression des sulfotransférases dans les macrophages non activés (M0) par RT-PCR en temps réel (Figure 19).

Les macrophages M0 expriment 10 des 15 sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse des HS, avec un taux élevé pour les NDST1, NDST2, HS2ST, HS6ST1, HS3ST1 et HS3ST2. Pour les CS, 7 des 8 sulfotransférases impliqués sont exprimées, mais seules les C4ST1, C4ST3, C6ST2 et CHST15 présentent des niveaux relativement élevés. Même s'il n'est pas

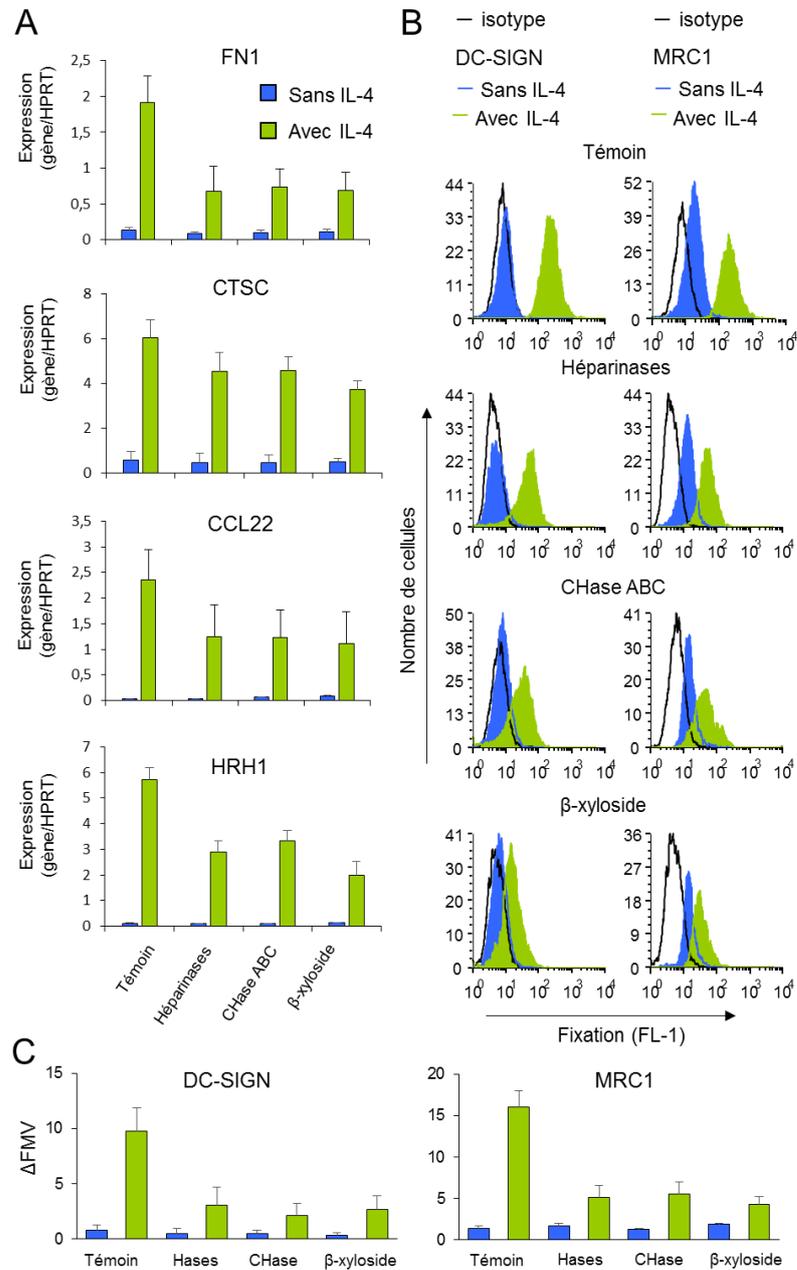


Figure 18 : Inhibition de l'activité de l'IL-4 par élimination des GAGs membranaires. Avant stimulation par l'IL-4, les macrophages ont été soit incubés pendant 2 h en présence de chondroïtinase ABC (CHase) ou d'un mélange d'héparinases I, II, III (HPases), soit traités pendant 24 h en présence de β-xyloside. **(A)** L'expression des ARNm de FN1, CTSC, CCL22 et HRH1 a été analysée par PCR en temps réel après 24 h de stimulation. L'expression du transcrite de l'HPRT est utilisée pour normaliser les données. Les valeurs ont été obtenues à partir de 4 expériences indépendantes. **(B)** Après 36 h de stimulation, l'expression de DC-SIGN et de MRC1 a été analysée par cytofluorimétrie en flux. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences distinctes. **(C)** Les données, exprimées en variations moyennes de fluorescence correspondent aux moyennes ± S.D des valeurs obtenues à partir de trois expériences indépendantes

possible d'établir une relation directe entre les niveaux d'expression de ces enzymes et le taux de modifications au sein des chaînes GAGs, la forte expression de certaines de ces sulfotransférases suggère qu'elles ont un rôle majeur dans la génération des motifs spécifiques aux macrophages. Les travaux précédents avaient montré que l'IL-4 se lie avec une forte affinité à l'héparine (Lortat-Jacob et al., 1997). Etant donné la richesse en disaccharides [IdoUA2S-GlcNS6S] dans ce polysaccharide, nous avons choisi d'invalider l'expression des NDST1, HS2ST et HS6ST1. Pour les CS, notre choix s'est porté sur les trois sulfotransférases impliquées dans les réactions de 2- et 6-O-sulfation, C6ST2, CHST15 et UST. Les macrophages ont été transfectés par des siRNA ciblant spécifiquement chaque sulfotransférase. L'efficacité de l'invalidation a été estimée en mesurant la diminution de l'expression des enzymes par RT-PCR en temps réel. De plus, afin de s'assurer de l'absence de réactions croisées, le niveau d'expression des autres sulfotransférases a également été analysé (Figure 20).

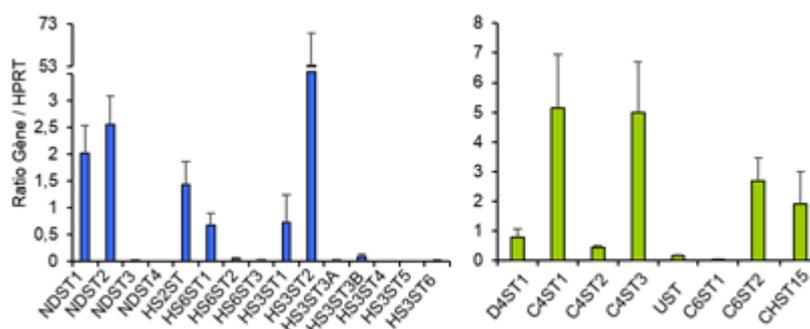


Figure 19 : Expression des sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse des HS et CS/DS dans les macrophages. Le niveau d'expression des ARNm de chaque sulfotransférase est quantifié par PCR en temps réel. L'expression du transcrite de l'HPRT est utilisée pour normaliser les données. Les valeurs sont des moyennes \pm S.D de 6 expériences distinctes.

Comme nous l'attendions, le traitement des macrophages avec les siRNA ciblant les NDST1, HS2ST et HS6ST1 induit une diminution des transcrits de 86 %, 92 % et 85 %, respectivement par rapport aux cellules traitées avec un siRNA contrôle. De même, les invalidations obtenues avec les siRNA ciblant les C6ST2, CHST15 et UST sont efficaces avec une diminution de 85%, 72% et 87% de l'expression des transcrits, respectivement. De plus, les siRNA utilisés sont spécifiques des enzymes ciblées puisque l'on ne note pas de variations significatives de l'expression des autres sulfotransférases dans les macrophages invalidés. En outre, la transfection n'affecte pas la survie des macrophages, qui reste équivalente à celle des cellules non transfectées après deux jours de culture.

Nous avons ensuite reproduit les tests de réponses à l'IL4 avec les macrophages invalidés pour l'expression de sulfotransférases (Figure 21). En premier lieu, nous avons vérifié que l'IL-4 est toujours capable d'induire l'expression des différents marqueurs M2 dans les macrophages transfectés par le siRNA contrôle, ce qui confirme que la transfection n'a pas affecté la capacité

des cellules à répondre à la cytokine. Les expériences ont alors été reproduites avec les siRNA spécifiques. L'invalidation de la NDST1 conduit à une diminution d'environ 50% de l'expression de DC-SIGN induite par l'IL-4. L'effet est légèrement moins marqué après invalidation de HS6ST1, avec une diminution de 38% de l'expression de DC-SIGN. En revanche, l'invalidation de HS2ST n'a aucun effet sur l'activité de l'IL-4, puisque l'expression de DC-SIGN est identique à celle observée dans les macrophages traités avec le siRNA contrôle. L'inhibition des enzymes ciblant les CS apparaît moins efficace pour réduire les réponses induites par l'IL-4. En effet, l'invalidation de la C6ST2 ne réduit l'expression de DC-SIGN que de 15 %. L'UST ne semble pas nécessaire à l'activité de l'IL-4, puisque son inhibition n'a pas d'effet sur l'expression du marqueur M2. Seule l'invalidation de CHST15 est efficace, puisqu'elle conduit à une diminution d'environ 50 % de l'expression membranaire de DC-SIGN. Ces résultats ont alors été vérifiés avec un autre marqueur M2. En suivant la transcription de FN1 par RT-PCR en temps réel, nous avons confirmé que l'invalidation des NDST1 et CHST15 sont les plus efficaces pour réduire les réponses induites par l'IL-4 sur les macrophages. Les invalidations des HS6ST1 et C6ST2 conduisent également à une diminution de l'activité de la cytokine, mais dans de moindres mesures. Par contre, l'inhibition des 2-*O*-sulfotransférases HS2ST et UST n'a aucun effet sur les réponses induites par l'IL-4.

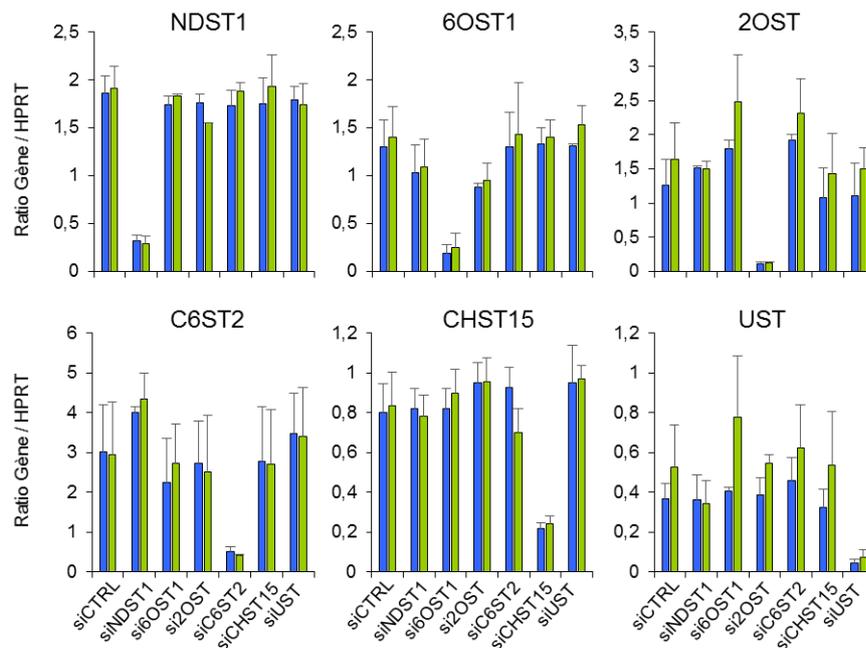


Figure 20 : Efficacité de l'invalidation des sulfotransférases dans les macrophages. Après 48 h de traitement par les siRNA, les macrophages ont été stimulés (barres vertes) ou non (barres bleues) par l'IL-4 pendant 24 h. L'expression des transcrits a été quantifiée par PCR en temps réel. Le transcrite de l'HPRT est utilisé pour normaliser les données. Les valeurs sont des moyennes \pm S.D d'au moins 3 expériences indépendantes.

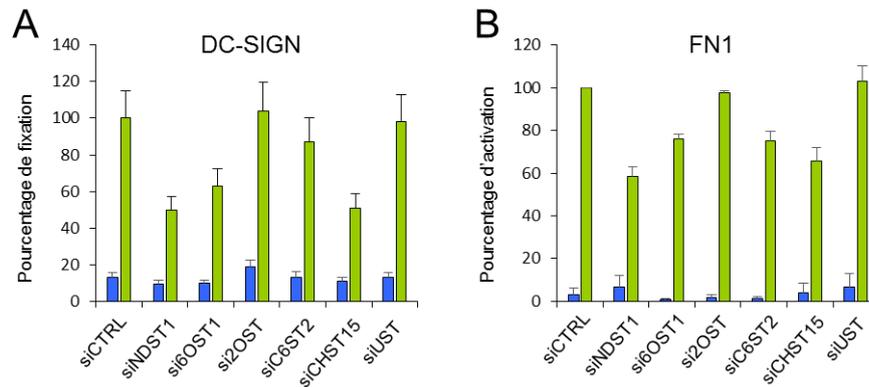


Figure 21 : Inhibition de l'activité de l'IL-4 par invalidation d'expression des sulfotransférases. Avant stimulation par l'IL-4, les macrophages ont été transfectés par les siRNA ciblant les sulfotransférases ou par un siRNA négatif (siCTRL) et laissés en culture pendant 48 h. (A) Après 36 h de stimulation par l'IL-4, l'expression de DC-SIGN a été analysée par cytofluorimétrie en flux. Les données, exprimées en pourcentage par rapport à la fixation des anticorps sur les cellules traitées avec le siRNA contrôle, correspondent aux moyennes \pm S.D des valeurs obtenues à partir de 3 expériences indépendantes. (B) Après 24 h de stimulation par l'IL-4, l'expression de FN1 a été analysée par PCR en temps réel. Le transcrit de l'HPRT est utilisé pour normaliser les données. Les valeurs sont des moyennes \pm S.D obtenues à partir d'au moins 2 expériences indépendantes.

Ces résultats confirment que les HS et les CS sont chacun capables de fixer l'IL-4 et de participer à la formation de son complexe de signalisation. De plus, ils montrent que la 6-*O*-sulfatation des GAGs est particulièrement importante pour l'interaction avec la cytokine. En effet, l'invalidation des deux 6-*O*-sulfotransférases HS6ST1 et CHST15 conduit à une réduction significative de l'expression des deux marqueurs M2. La *N*-sulfatation des HS semble aussi être une modification importante pour la fixation de l'IL-4 sur les HS. Cependant, il est connu que la réaction de *N*-sulfatation catalysée par la NDST1 est une étape nécessaire à l'action des autres sulfotransférases. Par conséquent, on ne peut pas exclure que les effets observés après invalidation de la NDST1 soit, du moins en partie, liée à une inhibition de la réaction de la 6-*O*-sulfatation. La 4-*O*-sulfatation des CS semble être également un pré-requis pour le motif reconnu par l'IL-4. En effet, les résultats obtenus par invalidation des C6ST2 et CHST15 sont clairement différents. Toutes les deux sont des 6-*O*-sulfotransférases agissant sur les CS, mais la première ajoute un groupement sulfate sur des disaccharides non sulfatés, alors que l'action de la CHST15 nécessite impérativement la présence d'un groupement 4-*O*-sulfate sur le résidu de GalNAc ciblé. Ainsi, la CHST15 est à l'origine des disaccharides 4-*O* et 6-*O*-sulfatés, alors que la C6ST2 conduit à la formation de disaccharides 6-*O*-sulfatés. La fixation de l'IL-4 sur les GAGs serait donc dépendante de la présence de groupements 6-*O*-sulfates, mais également d'une densité de sulfatation élevée. Pour les HS, la présence de groupements *N*-sulfates assurerait ce niveau de sulfatation, alors que dans les CS, ce rôle serait rempli par les groupements 4-*O*-sulfates. En revanche, les groupements 2-*O*-sulfates ne seraient pas utiles à la la fixation de l'IL-4, puisque les invalidations des HS2ST et UST n'ont aucun effet inhibiteur. La fixation de l'IL-4 ne serait

donc pas uniquement gouvernée par le taux de sulfatation des GAGs, mais également par le positionnement des groupements sulfates sur les osamines.

Pour confirmer que l'implication des GAGs est bien liée aux signaux intracellulaires délivrés par l'IL-4, nous avons analysé les voies de signalisation normalement activées dans les macrophages par fixation de la cytokine. Les essais ont été réalisés avec des macrophages invalidés pour NDST1 et CHST15, et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les cellules traitées par le β -xyloside. La principale voie activée par l'IL-4 conduit à la phosphorylation de STAT6 par les kinases JaK. Nos résultats montrent une nette diminution de l'activation de cette protéine après traitement par le β -xyloside ou invalidation de la NDST1 et la CHST15 (Figure 22). Ainsi, l'invalidation des deux sulfotransférases a bien un effet inhibiteur sur la formation du complexe de signalisation de l'IL-4, ce qui explique la réduction d'expression des marqueurs M2 observée dans les expériences précédentes.

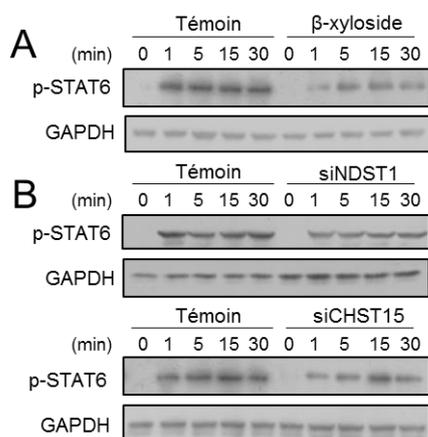


Figure 22 : Inhibition de l'activité de l'IL-4 par invalidation d'expression de NDST1 et CHST15. (A) Avant stimulation par l'IL-4, les macrophages ont été traités pendant 24 h en présence de β -xyloside (A), ou transfectés par les siRNA ciblant les sulfotransférases ou un siRNA négatif, puis laissés en culture pendant 48 h (B). Les cellules ont ensuite été stimulées en présence d'IL-4 puis lysées aux temps indiqués. La phosphorylation de STAT6 a été analysée après séparation des protéines en SDS-PAGE puis immunorévélation. Les résultats sont représentatifs de 3 manipulations indépendantes.

3.4. Compétition avec des oligosaccharides dérivés de GAGs

Les macrophages M2 sont impliqués dans de nombreux processus pathologiques. Aussi, il est intéressant de vérifier si un traitement par des oligosaccharides dérivés de GAGs est efficace pour inhiber la polarisation induite par l'IL-4. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé les variations d'expression des marqueurs DC-SIGN et MRC-1 induits par la cytokine en présence de concentrations croissantes d'oligosaccharides d'héparine ou de CS (Figure 23). L'expression de DC-SIGN est significativement réduite à partir de 10 ng/mL d'oligosaccharides d'héparine, alors que la même inhibition nécessite une concentration 10 fois plus élevée en CS. Ces données indiquent que l'héparine est plus efficace que les CS, ce qui est probablement lié aux interactions de plus haute affinité entre l'IL-4 et l'héparine (Lortat-Jacob *et al.*, 1997). Toutefois, cet effet n'est plus visible aux fortes concentrations, puisque le maximum d'inhibition est atteint dans les deux cas pour des concentrations supérieures à 300 ng/mL. L'expression de MRC1 est également altérée après addition des oligosaccharides, mais l'effet est moins marqué

et nécessite des concentrations plus élevées en inhibiteurs. Toutefois, on peut noter que l'expression basale de MRC1 est déjà importante en absence d'IL-4, ce qui peut expliquer pourquoi les GAGs ont une activité moindre. Dans leur ensemble, ces résultats montrent que les réponses induites par l'IL-4 peuvent être inhibées par des oligosaccharides solubles. L'utilisation de telles molécules pourrait donc fournir des outils pour inhiber l'activation alternative des macrophages. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer l'efficacité d'un tel traitement *in vivo*.

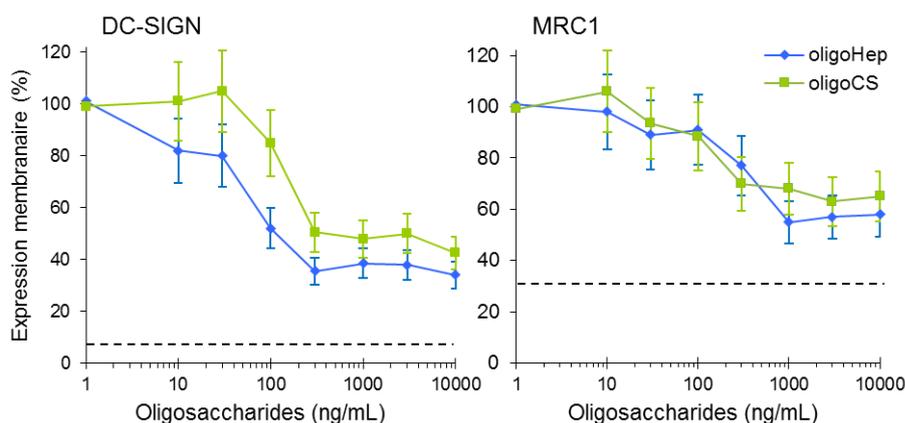


Figure 23 : Effet d'oligosaccharides dérivés des GAGs sur l'expression des marqueurs M2 induits par l'IL-4. Les macrophages ont été stimulés par l'IL-4 (10 ng/ml) pendant 36 h en présence de concentrations croissantes en oligosaccharides (dp10) dérivés d'héparine (oligoHep) ou de CS (oligoCS). Après 36 h d'incubation, l'expression de DC-SIGN et de MRC1 a été analysée par cytofluorimétrie en flux. Les données, exprimées en pourcentage par rapport à l'expression des deux marqueurs en absence des oligosaccharides, correspondent à la moyenne des valeurs \pm S.D obtenues à partir de trois expériences indépendantes. Les lignes pointillées représentent le niveau d'expression basal des deux marqueurs en absence de stimulation par l'IL-4.

3.5. Modélisation moléculaire des interactions GAGs/IL-4

Les travaux précédents étant en faveur d'une interaction spécifique entre l'IL-4 et les GAGs, nous avons donc entrepris la modélisation de cette interaction *in silico*. Nous avons choisi d'utiliser deux hexasaccharides dérivés soit de l'héparine, soit de CS-E. Le choix a été fait sur la base de nos résultats expérimentaux, qui montrent que la 6-O-sulfatation et la densité en sulfate sont deux critères importants pour cette interaction. L'oligosaccharide d'héparine utilisé pour la modélisation est sulfaté en positions N et C6 des résidus de GlcN et en position C2 des IdoUA. L'oligosaccharide de CS-E, quant à lui, est sulfaté en positions C4 et C6 des résidus de GalNAc.

Pour chaque interaction, les dix modèles présentant les énergies de liaison les plus faibles ont été retenus. Pour chacun d'entre eux, toutes les liaisons hydrogènes engagées entre l'oligosaccharide et l'IL-4 ont été énumérées, puis une carte de chaleur a été réalisée sur la base de ces données moyennées. Celle-ci met donc en exergue les acides aminés de l'IL-4 les plus souvent impliqués dans l'interaction avec les oligosaccharides dans les différents modèles

obtenus. Nous avons ainsi montré que les deux types d'oligosaccharides engagent souvent des liaisons avec les mêmes résidus K77, R81, R85 et R88 (Figure 24). Cependant, quelques différences peuvent être notées, puisque l'oligosaccharide d'héparine engage en plus des liaisons avec les résidus H74 et R75, alors que l'oligosaccharide de CS-E engage des interactions avec les résidus K12, R53 et K61. Ces légères différences peuvent être expliquées par l'orientation prise par les oligosaccharides lors de leur liaison à la protéine. En effet, les modèles obtenus suggèrent que l'héparine s'aligne parallèlement aux hélices A et C alors que

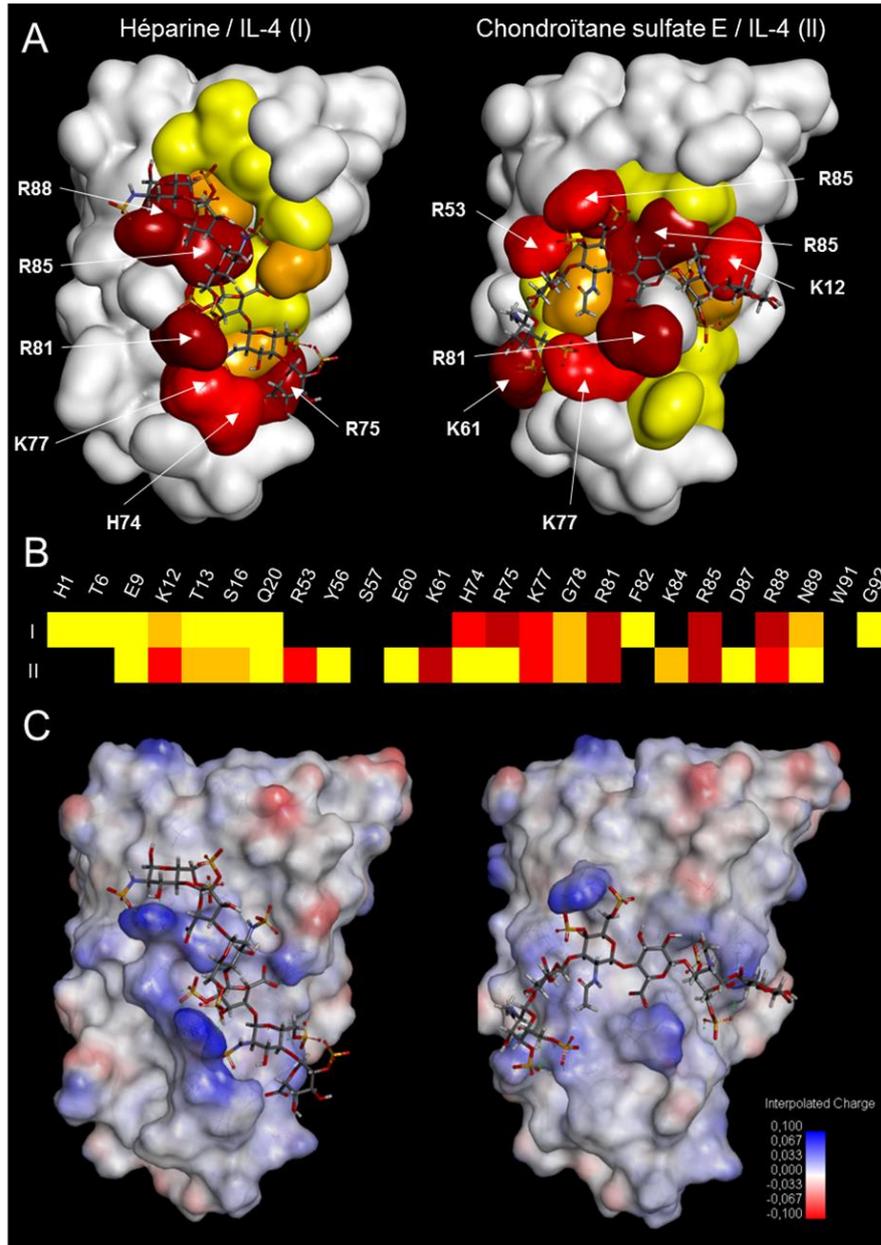


Figure 24 : Modélisation de l'interaction IL-4/GAGs. (A) Représentation de surface de l'IL-4 en complexe avec des hexasaccharides d'héparine ou de CS-E. Les acides aminés ont été colorés en fonction des fréquences reportées dans le panneau B. (B) Carte de chaleur représentant la fréquence à laquelle les acides aminés de l'IL-4 engagent des liaisons hydrogènes avec les oligosaccharides d'héparine (I) ou de CS-E (II). (C) Représentation de surface de l'IL-4 en complexe avec des hexasaccharides d'héparine ou de CS-E. La surface est colorée en fonction de la charge théorique de la protéine.

l'hexasaccharide de CS-E se place plutôt perpendiculairement à ces deux mêmes hélices. Bien que ces orientations soient retrouvées dans la grande majorité des modèles générés pour chaque type d'oligosaccharide, des preuves expérimentales seront nécessaires pour confirmer ces prédictions. Ainsi, l'étude de l'interaction entre le mutant IL-4 (K61A) et différents types d'oligosaccharides pourraient apporter un début de réponse.

Cette étude de modélisation moléculaire nous a également permis de confirmer l'importance de la 6-O-sulfatation dans les interactions. En effet, dans les nombreux modèles obtenus, ce sont ces groupements sulfates qui engagent le plus de liaisons avec l'IL-4.

Finalement, ces prédictions ont été utilisées pour identifier certains acides aminés, tels que les résidus K61, K77, R81, R85 et R88, et produire les mutants correspondants de l'IL-4 recombinante. Ces mutants permettront d'affiner nos connaissances sur les caractéristiques de l'interaction avec les GAGs et d'éprouver les modèles générés *in silico*.

3.6. Production et purification de l'IL-4 recombinante

L'étude de modélisation moléculaire a permis de caractériser des acides aminés potentiellement impliqués dans la fixation de l'IL-4 sur les GAGs. Afin de valider expérimentalement l'importance de ces acides aminés, nous avons décidé de produire des formes recombinantes mutées de la cytokine, de façon à pouvoir tester leur activité dans notre modèle de polarisation M2 des macrophages.

La stratégie mise en œuvre pour atteindre cet objectif a consisté à utiliser un système de production en cellules procaryotes, utilisant un vecteur d'expression contenant une séquence codant pour une étiquette 6xHis clivable. Cette étiquette facilite la purification de la protéine recombinante et peut être ensuite éliminée par traitement protéolytique dirigé, ce qui permet d'obtenir une forme mature pour les tests cellulaires. En outre, l'IL-4 contient trois ponts disulfures indispensables à l'acquisition de sa conformation correcte. Par conséquent, nous avons retenu une souche *E coli* particulière, nommée Origami B (DE3), ayant la capacité de faciliter la formation des ponts disulfures et le repliement des protéines exprimées. Afin de produire la protéine étiquetée, le plasmide pET15b a été choisi comme vecteur d'expression puisqu'il rassemble toutes les caractéristiques désirées. Après clonage de la séquence codant pour l'IL-4 humaine dans le plasmide, plusieurs autres constructions ont été réalisées par mutagenèse dirigée. Tout d'abord, nous avons construit un mutant pour les trois résidus d'arginine (R81, R85, R88) les plus souvent engagés dans la fixation des chaînes de GAGs dans nos modèles *in silico*. Deux autres formes mutées au niveau des lysines K61 et K77 ont été construites, étant donné que ces résidus semblent également particulièrement importants pour les interactions. Dans les trois cas, les résidus ciblés ont été remplacés par des alanines.

Les premiers essais de production ont été réalisés avec la souche Origami B (DE3) en utilisant les vecteurs dérivés du plasmide pET15b (Figure 25A). L'utilisation du plasmide pET15b permet de produire une protéine de fusion formée d'une étiquette 6xHis en Nt, d'un site de coupure protéolytique spécifique de la thrombine et de la séquence de la protéine d'intérêt. Cette approche nous a permis de récupérer l'IL-4 recombinante avec un taux de pureté satisfaisant après passage sur colonne Ni-NTA. En revanche, nous avons obtenu des quantités très faibles. De plus, les étapes de coupure de l'étiquette 6xHis par la thrombine, puis l'élimination de la protéase nous ont posé des problèmes majeurs. En effet, bien que nous soyons parvenus à couper l'étiquette, nous n'avons pas réussi à éliminer la thrombine sans perdre l'IL-4 recombinante. Pour améliorer ces étapes, nous avons essayé une stratégie consistant à passer la solution sur une colonne de billes d'agarose couplées à la para-aminobenzamidine. En effet, ce gel d'affinité est décrit pour retenir spécifiquement la thrombine. Cependant, nous nous sommes rendu compte que l'IL-4 recombinante, déjà présente en faible quantité, était également retenu sur la colonne.

Après plusieurs autres essais infructueux, nous avons donc décidé de changer de vecteur d'expression et d'utiliser le pET151/D-TOPO. Ce dernier possède les mêmes caractéristiques que le pET15b à la différence qu'il contient un site de coupure pour la TEV protéase. Nous l'avons choisi cette approche car la TEV protéase est commercialisée avec une étiquette 6xHis, ce qui permet de l'éliminer par simple passage sur colonne Ni-NTA. Ainsi, après coupure de l'étiquette 6xHis de l'IL-4 recombinante, un second passage sur la colonne doit permettre en théorie d'éliminer simultanément la TEV protéase et l'étiquette 6xHis, et par conséquent de récupérer l'IL-4 recombinante purifiée dans la fraction non retenue. Après avoir réalisé les nouvelles constructions, plusieurs essais de production ont été réalisés. Bien que nous soyons parvenus à produire de l'IL-4 recombinante par cette approche, les quantités obtenues sont faibles, avec des rendements compris entre 50 et 200 µg par litre de culture.

Afin d'augmenter les quantités, nous avons alors choisi de changer de souche bactérienne et d'utiliser les Rosetta-gami B (DE3) (Figure 25B). En effet, la séquence codant pour l'IL-4 contient plusieurs codons rares, pouvant être à l'origine des faibles rendements obtenus. La souche Rosetta-gami B (DE3) possède un plasmide (pRARE), qui code pour la production des ARNt ciblant ces codons rares et permet donc d'augmenter la traduction des protéines d'origine eucaryote. Les différents essais réalisés avec cette souche ont permis de produire des quantités supérieures d'IL-4 recombinante. Pour éviter les corps d'inclusion, nous avons ensuite testé différentes conditions de production en modulant notamment la température d'incubation ainsi que la concentration en IPTG utilisé pour induire l'expression. En effet, nous

avons vérifié au préalable que l'extraction de l'IL-4 précipitée dans les corps d'inclusion ne permet pas récupérer la cytokine sous forme active pour les tests cellulaires. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 1 mM d'IPTG et une température d'incubation de 15°C.

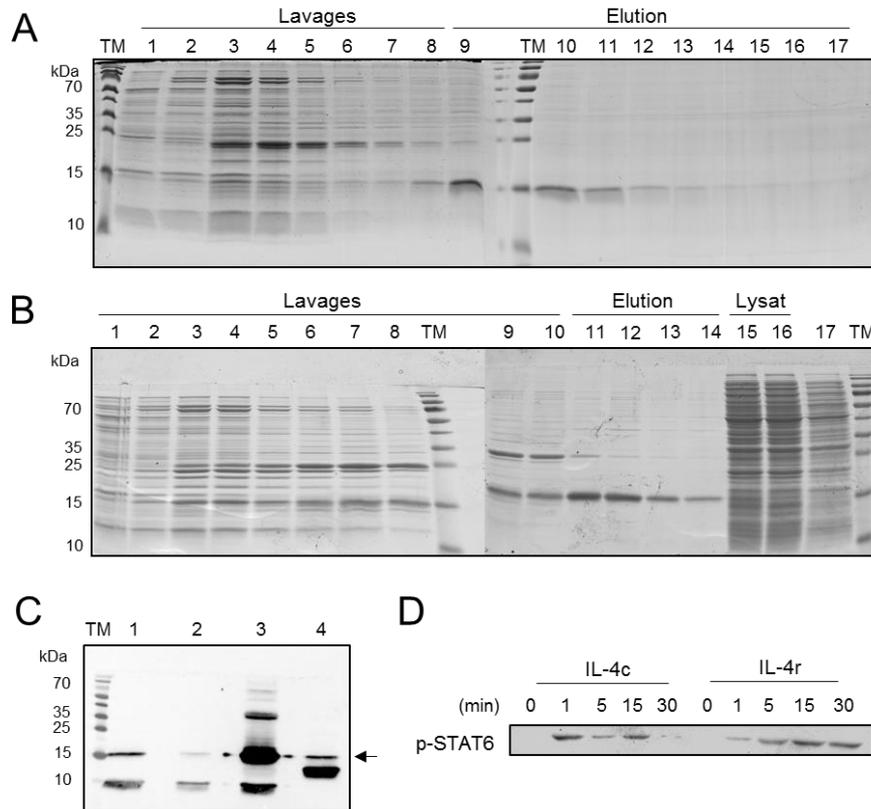


Figure 25 : Production d'IL-4 recombinante en système procaryote. **(A-B)** Analyse par SDS-PAGE des fractions correspondant aux étapes de purification sur colonne Ni-NTA. L'IL-4 wt recombinante est produite à partir du vecteur pET15b dans la souche Origami B DE3 **(A)** : 1 à 8, fractions d'élution obtenues avec un gradient allant de 10 mM à 100 mM d'imidazole ; 9 à 17, fractions d'élution obtenues avec un gradient allant de 100 mM à 250 mM d'imidazole ; ou dans la souche Rosetta-gami B DE3 **(B)** : 1 à 10, fractions d'élution obtenues avec un gradient allant de 10 mM à 100 mM d'imidazole ; 11 à 14, fractions d'élution obtenues avec un gradient allant de 150 mM à 250 mM d'imidazole ; 15, lysat avant passage sur colonne Ni-NTA ; 16, fraction NR du lysat après passage sur colonne Ni-NTA ; 17, première fraction de lavage. **(C)** Immuno-détection de l'IL-4 par Western-Blot (1 et 2, lysat clarifié ; 3, culot obtenu après lyse ; 4, témoin (IL-4 commerciale)). La différence de masse moléculaire est due à la présence de l'étiquette His-tag dans notre protéine **(D)** Analyse de l'activation de la voie STAT-6 par Western-Blot. Les cellules ont été stimulées en présence de 10 ng/mL d'IL-4 commerciale ou d'IL-4 produite au laboratoire. Aux temps indiqués, les cellules ont été lysées et la phosphorylation de STAT6 a été vérifiée après séparation des protéines en SDS-PAGE puis immunorévéléation avec un anticorps anti-phospho-STAT6.

La réalisation d'un Western-Blot en utilisant un anticorps spécifique de l'IL-4 nous a permis de montrer que notre production était efficace et de confirmer la présence de notre protéine (Figure 25C). De plus, l'activité de l'IL-4 wt recombinante a été testée sur une lignée cellulaire pro-monocytaire (THP1), ce qui nous a permis de confirmer qu'elle était bel et bien active. En effet, l'analyse de l'activation de la voie STAT6 montre que notre protéine recombinante possède une activité équivalente, voire supérieure, à l'IL-4 commerciale (Figure

25D). Cependant, les quantités obtenues restent faibles et plusieurs productions seront nécessaires pour obtenir suffisamment de matériel et réaliser toutes les expériences prévues.

IV. Discussion

Les travaux de H. Lortat-Jacob (Lortat-Jacob et al., 1997) avaient montré dans un système acellulaire que les GAGs interagissent avec l'IL-4. En réalisant des expériences de compétition de fixation, il avait montré que les paramètres de fixation étaient différents en fonction de la nature du GAG, mais également de la densité et du type de sulfatation. Ainsi, la fixation de la cytokine a une affinité similaire pour les HS, les DS et les CS-C, alors que la fixation est nettement plus faible avec les CS-A. Par la suite, peu de travaux ont porté par la suite sur le rôle physiologique de ces interactions, si ce n'est la démonstration que la différenciation des monocytes en cellules dendritiques induite *in vitro* par l'IL-4 fait intervenir des interactions avec les GAGs membranaires. Parmi ses nombreuses activités, l'IL-4 est un élément essentiel de l'activation M2 des macrophages (Gordon et al., 2010). En outre, ces cellules expriment un grand nombre de protéoglycanes à chaînes HS et CS (Wegrowski et al., 2006). Sur la base de ces données, nous avons étudié le rôle des GAGs dans la polarisation M2 des macrophages induite *in vitro* par l'IL-4.

Le phénotype des macrophages M2 peut être caractérisé en étudiant l'expression de nombreux marqueurs spécifiques. En effet, l'activation alternative induit l'expression ou la surexpression de nombreux gènes et en réprime d'autres (Martinez et al., 2006). Ces modifications sont essentiellement sous la dépendance des voies de signalisation activées par l'IL-4 et l'IL-13. Nous avons observé que l'IL-13 seule est moins efficace que l'IL-4 pour induire l'expression des mêmes marqueurs M2 *in vitro*. Cette différence est certainement liée au fait que l'IL-13 ne possède qu'un type de récepteur (IL-4R α /IL-13R α 1), alors que l'IL-4 est capable de se fixer sur son récepteur spécifique (IL-4R α / γ c) mais également sur le récepteur de l'IL-13 (Jiang et al., 2000). Les deux récepteurs étant exprimés par les macrophages, il n'est pas surprenant que l'IL-4 ait une activité plus forte, voire un spectre d'action plus large, et qu'elle soit suffisante pour induire l'activation M2 des macrophages dans les modèles *in vitro*.

Pour appréhender le rôle des GAGs dans la polarisation M2 induite par l'IL-4, nous avons d'abord utilisé une approche visant à les éliminer de la surface des macrophages. Le β -xyloside est un inhibiteur général de la synthèse des GAGs, car il inhibe le transfert du xylose dans le tétrasaccharide de liaison qui permet l'ancrage des chaînes HS et CS/DS sur les protéoglycanes. Le traitement des macrophages par ce composé entraîne une forte inhibition des réponses cellulaires induites par l'IL-4, ce qui indique qu'un des deux types de GAGs, voire

les deux, participe à l'activité de la cytokine. Nous avons alors utilisé les enzymes de dégradation spécifiques des HS (héparinases I, II et III) ou des CS/DS (chondroïtinase ABC). Ces traitements enzymatiques sont également capables de diminuer les activités de la cytokine de manière significative. En effet, l'élimination sélective des HS ou des CS/DS conduit à des inhibitions du même ordre de grandeur, suggérant que les deux types de GAGs participent de manière équivalente à la fixation et l'activité de la cytokine. Ces premiers résultats peuvent paraître surprenants, étant donné que la majorité des travaux reportés dans la littérature décrivent un rôle prépondérant des HS dans la régulation de l'activité de nombreuses cytokines (Capila et al., 2002; Zhang, 2010). En effet, les CS ont longtemps été considérés comme ayant un rôle essentiellement structural. Des travaux plus récents ont toutefois suggéré une diversité fonctionnelle beaucoup plus large pour ces molécules. Ils interviennent par exemple dans la fixation et les activités de la cytokine, du FGF-7 et de la pléiotrophine (Deepa et al., 2002; Kawashima et al., 2002). Comme pour les HS, les activités régulatrices des CS/DS seraient dépendantes des interactions entre leurs ligands et des motifs particuliers, de type CS-B (DS), CS-C ou CS-E (Malavaki et al., 2008; Sugahara et al., 2003). Ainsi, la fixation de l'IL-4 sur les GAGs serait plutôt dépendante d'un profil de sulfatation plutôt que du type d'hexosamine, ce qui expliquerait l'implication équivalente des HS et des CS/DS.

Nous avons ensuite utilisé une approche consistant à invalider par ARN interférence l'expression de sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse des HS et des CS/DS. De nombreuses sulfotransférases interviennent dans l'étape de maturation des GAGs : 17 pour les HS et 8 pour les CS/DS. Après avoir identifié les enzymes exprimées dans les macrophages, nous avons choisi d'invalider l'expression des NDST1, HS6ST1 et HS2ST pour les HS sulfotransférases et C6ST2, CHST15 et UST pour les CS sulfotransférases.

La NDST1 transfère un groupement sulfate sur la fonction amine des résidus de GlcNAc, et cette étape est nécessaire à l'action des sulfotransférases suivantes et de l'épimérase. Il a d'ailleurs été démontré que l'invalidation de cette enzyme conduit à une réduction générale du taux de-sulfatation dans les chaînes HS (Kjellén, 2003; Ringvall et al., 2000). Dans cette étude, nous avons montré que l'invalidation de la NDST1 réduit efficacement les réponses induites par l'IL-4, suggérant que la *N*-sulfatation ou plus globalement le taux de sulfatation générale des HS est important pour la fixation de la cytokine. Comme le niveau de *O*-sulfatation paraît aussi avoir un rôle important dans les interactions (Lortat-Jacob et al., 1997), nous avons voulu déterminer si la position de ces groupements avaient une influence sur l'interaction. Nous avons alors choisi d'invalider la HS6ST1, 6-OST la plus exprimée dans les macrophages, ainsi que la HS2ST, responsable de la sulfatation en position C2 de l'acide

uronique. Ces expériences nous ont permis de montrer que la position des groupements *O*-sulfates est au moins aussi importante que le taux de sulfatation globale des HS pour la fixation de l'IL-4. En effet, l'inactivation de la HS6ST1 conduit à une inhibition conséquente des réponses induites par l'IL-4, alors que l'inactivation de la HS2ST n'a aucun effet significatif. Ainsi, la fixation de l'IL-4 sur les HS serait dépendante de la présence de groupements *N*- et 6-*O*-sulfates.

Comme pour les HS, la 2-*O*-sulfatation des CS ne semble pas nécessaire à la fixation de l'IL-4, puisque l'inactivation de l'UST n'a pas d'effet sur l'activité de la cytokine. La C6ST2 et la CHST15 sont deux 6-*O*-sulfotransférases agissant sur les CS. Cependant elles présentent des spécificités de substrats différentes. En effet, la C6ST1 ne transfère un groupement sulfate que sur les résidus de GalNAc non sulfatés, alors que la CHST15 a une activité galactosaminyl-4-sulfate 6-*O*-sulfotransférase et intervient dans la génération de motifs de type CS-E (Fukuta et al., 1998b; Habuchi et al., 2002). Nos résultats ont montré que l'inhibition de l'expression de la C6ST2 n'a qu'un effet modéré sur la fixation de l'IL-4. En revanche, l'inactivation de CHST15 conduit à une diminution nette de l'activité de la cytokine. Ces résultats indiquent que les CS impliqués dans la fixation de l'IL4 seraient plutôt de type CS-E, et que la 6-*O*-sulfatation aurait ici aussi une importance particulière dans les réponses induites par la cytokine. Il nous reste à vérifier cette hypothèse en invalidant l'expression de la C4ST1, puisque la 4-*O*-sulfatation des résidus GalNAc est un pré-requis à l'action de la CHST15.

Les renseignements apportés par les tests d'inactivation confirment les premiers résultats obtenus avec les enzymes de dégradation, et sont en faveur d'une participation équivalente des HS et des CS/DS. De plus, ils nous ont permis de mettre en évidence que la fixation de l'IL-4 nécessite un taux de sulfatation élevé pour se fixer aux GAGs. Toutefois, ce niveau de sulfatation serait apporté par les modifications des osamines (GlcNS6S pour les HS et GalNAc4S6S pour les CS). En effet, la fixation de l'IL-4 est indépendante de la 2-*O*-sulfatation des deux types de GAGs.

Considéré depuis quelques années comme une sous-classe de macrophages M2, les TAM participent à la mise en place d'un microenvironnement tissulaire favorable à la survie et à la croissance des tumeurs. La différenciation de ces macrophages serait sous la dépendance de nombreux facteurs sécrétés, soit par les autres leucocytes infiltrés, soit par les cellules tumorales elles-mêmes (Galdiero et al., 2013). Parmi ces facteurs, l'IL-4 a un rôle central, puisqu'elle est sécrétée par de nombreux types de cellules cancéreuses ainsi que par les lymphocytes infiltrés, et qu'elle permet d'induire la polarisation M2 des macrophages au sein de la tumeur (Wang et al., 2010). Les TAM produisent des facteurs caractéristiques des

macrophages M2, tels que la CTSC, qui favorise la croissance et la dissémination des tumeurs en activant les mécanismes de dégradation des matrices extracellulaires (Gocheva et al., 2010), ou des facteurs anti-inflammatoires et anti-apoptotiques, qui vont participer à la mise en place d'un environnement tolérant pour les cellules tumorales. Etant donné l'implication des GAGs dans la régulation de processus physiopathologiques variés, de nombreux Laboratoires se sont orientés ces dernières années sur la recherche de mimétiques de GAGs dans le but de développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique (Rek et al., 2009). Dans ce contexte, des molécules capables de bloquer les activités de l'IL-4 auraient un effet bénéfique, car elles pourraient être efficaces pour réduire la production de facteurs de survie et la prolifération des cellules tumorales, les rendant ainsi plus sensibles aux traitements anti-cancéreux. Nous avons donc décidé d'analyser l'effet d'oligosaccharides solubles dérivés de GAGs sur la polarisation M2 des macrophages induite par l'IL-4. Ainsi, l'addition de dp10 dérivés d'héparine et de CS réduit l'expression de marqueurs M2 induits par l'IL-4, à partir d'une concentration de 20-30 ng/mL. Ces résultats suggèrent que des molécules dérivées des GAGs pourraient avoir des applications dans les pathologies où l'IL-4 est incriminée, et particulièrement dans le cas des tumeurs cancéreuses qui présentent de forts taux d'IL-4 et une infiltration élevée de macrophages.

Sur la base de ces travaux, nous avons réalisé en collaboration avec Gérard Vergoten la modélisation de la liaison de l'IL-4 à un hexasaccharide (dp6) d'héparine ou de CS-E. L'étude comparée des deux modèles a permis d'identifier les acides aminés de la cytokine potentiellement impliqués dans les interactions. D'après les données de la littérature, l'IL-4 se fixe en premier lieu à la chaîne IL-4R α , et le complexe formé recrute ensuite la seconde sous-unité du récepteur (γ c ou IL-13R α 1) (Nelms et al., 1999). L'étude comparée de nos modèles moléculaires montrent que le site d'interaction avec les GAGs est proche du site de fixation de la chaîne IL-4R α , mais qu'il y a peu de recouvrement. Par analogie avec les modèles décrits précédemment, ces observations suggèrent que la fixation aux GAGs membranaires pourrait intervenir dans des mécanismes de concentration de la cytokine à la surface cellulaire, de présentation de l'IL-4 à la chaîne IL-4R α et/ou dans la stabilisation des interactions. Selon ces modèles, l'absence de GAGs membranaires aurait pour conséquence de réduire la stabilité des interactions entre la cytokine et ses récepteurs, expliquant ainsi la réduction de signalisation que nous avons observée dans notre étude.

D'après nos modèles, l'interaction avec le dp6 d'héparine engage principalement les résidus H74, R75, K77, R81, R85 et R88. Les mêmes résidus K77, R81, R85 et R88 sont retrouvés dans les interactions avec les CS, alors que l'engagement des autres résidus K12, R53

et K61 est spécifique à ce type de GAGs. Dans le but de valider ces modèles expérimentalement, nous avons entrepris la production de la cytokine recombinante et de mutants modifiées au niveau des acides aminés potentiellement impliqués dans l'interaction. Etant donné les problèmes rencontrés pour la production de l'IL-4 recombinante, les expériences envisagées avec ces protéines n'ont pas pu être réalisées. Cependant, les derniers essais de production sont prometteurs et devrait permettre de produire les quantités de protéines nécessaires pour entreprendre des études d'interactions.

Chapitre 2: Modifications structurales et fonctionnelles des GAGs induites par la polarisation M1/M2 des macrophages

I. Introduction

La polarisation des macrophages induit de profondes modifications dans l'expression des cytokines et de récepteurs membranaires impliquées dans les réponses inflammatoires. Ainsi, les macrophages M1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-12, l'IL-23, le TNF- α ou encore l'IL-6, et surexpriment des molécules membranaires tels que le CMH-II et les récepteurs de costimulation qui lui sont associés (CD80, CD86). A l'inverse, les macrophages M2 répriment l'expression des facteurs exprimés par les macrophages M1 et expriment d'autres types de cytokines, telles que l'IL-10 et le TGF- β , ainsi que des récepteurs qui auront un rôle anti-inflammatoire et des fonctions dans le remodelage tissulaire, notamment DC-SIGN et MRC1 (Martinez et al., 2006).

Les différences entre macrophages M1 et M2 sont finement régulées aux niveaux épigénétique, transcriptionnel et post-transcriptionnel (Tugal et al., 2013; Van den Bossche et al., 2014). Certains mécanismes épigénétiques sont régulés par les processus de méthylation, acétylation ou phosphorylation des histones et autres protéines liant l'ADN, ainsi que par méthylation et hydroxyméthylation des îlots CpG dans certains gènes. Dans les macrophages, plusieurs modifications de ce type ont été impliquées dans la régulation de la polarisation. En plus de cette régulation épigénétique, la polarisation est étroitement régulée par des mécanismes transcriptionnels, qui font intervenir un grand nombre de facteurs de transcription. Finalement, l'état d'activation des macrophages est également sous le contrôle de certains microARN (Tableau 4) (Tugal et al., 2013).

Ces différents processus de régulation modifient profondément le phénotype des macrophages, ce qui va non seulement affecter l'expression des cytokines et des récepteurs impliqués dans les réponses inflammatoires et immunes, mais également de nombreuses voies métaboliques. Ainsi, il a été montré que les métabolismes du glucose, de certains acides aminés, des lipides, du fer, du NAD⁺ ou encore du glutathion sont fortement impactés par la polarisation des macrophages. Par exemple, les macrophages vont favoriser la voie anaérobie de la glycolyse en réponse à des stimuli pro-M1. Cet effet est surtout lié à la réduction de l'expression de L-PFK2 (*liver-phosphofructokinase 2*) au profit de l'isoforme uPFK2 beaucoup plus active, ce qui permet le maintien d'une concentration élevée en fructose-2,6-diphosphate. Le

métabolisme de certains facteurs lipidiques est également modifié suite à la polarisation. Par exemple, l'expression de COX2 (Cyclo-Oxygénase 2) et de mPGES (*membrane-associated PGE Synthase*), deux enzymes du métabolisme de l'arachidonate, est augmentée dans les macrophages M1, ce qui augmente la production de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires. Par contre, les macrophages M2 expriment plutôt les enzymes ALOX15 (*Arachidonate 15-Lipoxygenase*) et COX1, qui sont impliquées dans la synthèse de lipides anti-inflammatoires. Une autre différence entre les macrophages polarisés concerne le métabolisme de l'arginine. Les macrophages M1 expriment l'enzyme iNOS, qui synthétise du NO à partir de l'arginine. Par contre, l'expression de l'arginase-1 dans les macrophages M2 favorise la production de polyamines, nécessaires au remodelage tissulaire. Le métabolisme du fer est également dépendant de l'état de polarisation, puisque les macrophages M1 ont tendance à séquestrer le fer *via* l'expression de la ferritine, ce qui a une action bactériostatique. En revanche, les macrophages M2 surexpriment le récepteur CD163 et la ferroportine et favorisent donc l'export du fer, ce qui est indispensable aux mécanismes de réparation tissulaire. Finalement, l'expression du glutathion est aussi largement modifiée, puisque les M1 en produisent de fortes quantités alors qu'il est quasi absent dans les M2. L'environnement est donc plus réducteur dans les macrophages M1, ce qui est nécessaire à leur activité pro-inflammatoire (Biswas et al., 2012).

Les GAGs de surface sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, et leur biosynthèse est dépendante du type cellulaire et de son état d'activation et/de différenciation. Il est donc probable que la polarisation de macrophages entraîne des modifications au niveau quantitatif et/ou qualitatif de ces molécules. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons extrait et dosé les GAGs portés par les deux types de macrophages. Puis, nous avons analysé l'expression des sulfotransférases, de façon à faire le lien entre leurs modifications structurales et d'éventuelles variations dans l'expression de leurs enzymes de maturation. Finalement, nous avons comparé la fonction des GAGs produits par les macrophages dans un modèle de présentation du FGF-2 aux cellules cancéreuses.

Nos résultats montrent que les macrophages de type M2 produisent plus de HS que les macrophages M1. Les motifs de sulfatation sont différents sur les deux types de cellules, ce qui est corrélé à des modifications dans l'expression de certaines sulfotransférases. Puis nous avons montré que les GAGs portés par les macrophages M2 sont capables de présenter le FGF-2 aux cellules cancéreuses MDA-MB-231 et d'induire leur prolifération. Ces résultats suggèrent que les macrophages sont capables de modifier la structure de leur GAGs pour s'adapter à leur environnement inflammatoire.

Tableau 4 : Les facteurs impliqués dans la polarisation des macrophages

| Nom | Fonction |
|---------------|--|
| STATs | STAT1 : activation par l'IFN- γ ; transcription de iNOS et de l'IL-12 dans les macrophages M1. STAT1/2 : activation par les IFNs de type I et les agonistes des TLRs ; inducteur de l'activation M1. STAT6 : activation par l'IL-4 et l'IL-13 ; inducteur de la transcription des facteurs de transcription KLF4 et PPARs ; inducteur de la polarisation M2. |
| NF κ B | Activation par stimuli inflammatoires ; inducteur de la polarisation M1. |
| AP-1 | Activation par stimuli inflammatoires ; inducteur de la transcription de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) ; inducteur de la polarisation M1. |
| IRFs | IRF9 : activation par l'IFN- β ; interaction avec STAT2 ; inducteur de la polarisation M1. IRF3 : activation par les agonistes des TLRs ; inducteur de la transcription de l'IFN- β ; inducteur de la polarisation M1. IRF5 ; inducteur de la transcription de l'IL-12 ; inducteur de la polarisation M1. IRF4 : activation par les agents d'origine fongiques et parasitaires ; inducteur de la polarisation M2. |
| HIFs | HIF-1 α : induction par NF- κ B ; régulateur de l'activité de iNOS ; exprimé par les macrophages M1. HIF-2 α : inhibiteur de la production de NO ; exprimé dans les macrophages M2. |
| PPARs | PPAR- γ : associé au complexe répresseur NCoR ; bloque l'activité transcriptionnelle des facteurs STATs, NF κ B et AP-1 ; inhibiteur de la polarisation M1. PPAR- δ : induction par la voie IL-4/STAT6 ; inducteur de la polarisation M2. |
| GRs | Récepteurs nucléaires : inhibiteur de la signalisation induite par AP-1 et NF κ B. |
| KLFs | KLF2 : inhibé par l'hypoxie et les ligands des TLRs. KLF4 : induction par IL-4 ; inducteur de la transcription de l'arginase ; inducteur de la polarisation M2. |
| miRs | miR-124 : bloque la traduction d'iNOS et du TNF- α ; favorise l'activation M2. miR-155 : induction par les agonistes des TLRs ; inhibiteur de l'expression de C/EBP β ; inducteur de la polarisation M1. miR-223 : déficience associée à une polarisation M1. |
| C/EBP β | C/EBP β : exprimé par les macrophages associés aux tumeurs ; inducteur de la polarisation M2. |

AP1 : activated protein-1 ; C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding proteins ; GR: glucocorticoid receptor ; HIF: hypoxia inducible factor ; IFN: interferon ; IRF: interferon-recognition factor ; KLF: krüppel-like factor ; miR: microRNA ; NF κ B: nuclear factor κ B ; NO: nitric oxide ; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor ; STAT: signal transducers and activators of transcription ; TLR: toll-like receptor ; TNF: tumor necrosis factor

(d'après (Tugal et al., 2013))

II. Publication

RESEARCH PAPER

Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans

Pierre Martinez, Agnès Denys, Maxime Delos, Anne-Sophie Sikora, Mathieu Carpentier, Sylvain Julien, Joël Pestel and Fabrice Allain

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche 8576 du Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Fédératif de Recherche 147, Université Lille Nord de France – Université des Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Abstract Macrophages are major cells of inflammatory process and take part in a large number of physiological and pathological processes. According to tissue environment, they can polarize into pro-inflammatory (M1) or alternative (M2) cells. Although many evidences have hinted to a potential role of cell-surface glycosaminoglycans (GAGs) in the functions of macrophages, the effect of M1 or M2 polarization on the biosynthesis of these polysaccharides has not been investigated so far. GAGs are composed of repeat sulfated disaccharide units. Heparan (HS) and chondroitin/dermatan sulfates (CS/DS) are the major GAGs expressed at the cell membrane. They are involved in numerous biological processes, which rely on their ability to selectively interact with a large panel of proteins. More than 20 genes encoding sulfotransferases have been implicated in HS and CS/DS biosynthesis, and the functional repertoire of HS and CS/DS has been related to the expression of these isoenzymes. In this study, we analysed the expression of sulfotransferases as a response to macrophage polarization. We found that M1 and M2 activation drastically modified the profiles of expression of numerous HS and CS/DS sulfotransferases. This was accompanied by the expression of GAGs with distinct structural features. We then demonstrated that GAGs of M2 macrophages were efficient to present FGF-2 in an assay of tumor cell proliferation, thus indicating that changes in GAGs structure may contribute to the functions of polarized macrophages. Altogether, our findings suggest a regulatory mechanism in which fine modifications in GAGs biosynthesis may participate to the plasticity of macrophage functions.

Keywords: glycosaminoglycan / macrophage / sulfotransferases

Introduction

Macrophages play a key role in inflammatory process and participate in a large number of physiological and pathological settings, imputable

to the high plasticity of their functional responses. Depending on environmental cues, they can indeed polarize into classically (M1) or alternatively (M2) activated cells, both of them representing phenotypic extremes of macrophage differentiation (Mosser et al. 2008). In response to some bacterial stimuli (e.g. LPS) and IFN- γ , macrophages undergo classic (M1) activation and produce large amounts of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α). Alternative activation (M2) occurs in response to IL-4, IL-13 and other factors as IL-10, TGF- β or glucocorticoids. M2-activated macrophages express high levels of scavenger receptors, lectins (e.g. DC-SIGN and mannose receptor) and anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-10) (Martinez et al. 2006). They have a low function of antigen presenting cells and exhibit anti-inflammatory and immunosuppressive activities (Gordon et al. 2010). Thus, M2 macrophages are preferentially involved in scavenging cell debris, promoting angiogenesis and repairing wounded or damaged tissues. In the context of cancer, such functions of M2 macrophages can be hijacked to favour tumor cell growth. This diverges consequentially from the phenotype of classically activated M1 macrophages, which are efficient pro-inflammatory and antigen presenting cells. This radical change of phenotype is the result of a profound reprogramming in gene expression and metabolism, which leads to large modification in functional repertoire of macrophages (Biswas et al. 2012).

Glycosaminoglycans (GAGs) are linear polysaccharides composed of repeating disaccharide units, which are the structural basis for their classification. Heparan (HS) and chondroitin/dermatan sulfates (CS/DS) are the major GAGs expressed at the cell membrane. They are covalently attached to a core protein, thus assembling to proteoglycans. HS and CS/DS are involved in numerous biological processes, which rely on their ability to selectively interact

with a large panel of proteins (Esko et al. 2002; Zhang 2010). Considering that a number of inflammatory and immuno-regulatory mediators interact with cell surface GAGs, these interactions could play an important role in inflammatory and immune responses (Taylor et al. 2006). As examples, they are implicated in the rolling of circulating leucocytes on inflamed endothelium and in the formation of a chemokine gradient that addresses migrating cells to the inflammatory site (Celie et al. 2009; Mortier et al. 2012). GAGs are also involved in the binding and immobilization of many cytokines and growth factors, thus promoting the accumulation of active molecules at high concentrations in the appropriate location to encounter their target cells and to facilitate the assembly with cognate receptors to initiate signal transduction (Sarrazin et al. 2011). More than 40 genes encoding glycosyl-transferases, epimerases and sulfotransferases have been identified in HS and CS/DS biosynthesis. The structural basis of HS backbone is a disaccharide unit comprising an N-acetylglucosamine residue (GlcNAc) and a glucuronic acid (GlcA) that can be variably modified. 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. The further modifications include C5-epimerization of some GlcUA into iduronic acid (IdoUA) residues, 2-O-sulfation of uronic acid (mostly IdoUA) residues, and finally 3-O and 6-O-sulfation of GlcN units. These modifications involve HS biosynthetic enzymes, including N-deacetylases/N-sulfotransferases (NDSTs), C5-epimerase and 2-O, 3-O, 6-O-sulfotransferases (HS2ST, HS3ST, HS6ST). In the general scheme of HS biosynthesis, GlcNAc modification by NDSTs creates the prerequisite substrate needed for the later enzymatic modifications. This first step of modification does not occur uniformly along the GAGs backbone, thus creating sulfation heterogeneity within the polymer with homogeneous, non or low sulfated regions alternating with hypervariable, highly sulfated domains, bordered by short transition zones with intermediate sulfation (Kreuger et al. 2012). Alternatively, CS/DS chains consist of repeating disaccharide units of uronic acid and N-acetyl galactosamine (GalNAc) instead of GlcNAc. CS/DS distinction depends on the nature of the uronic acid with CS containing GlcUA while DS contain IdoUA. CS/DS disaccharides are also modified through the addition of sulfate groups at position 2 of uronic acid residues and at position

4 and/or 6 of the GalNAc residues, using a variety of sulfotransferases (Zhang 2010). Importantly, most of HS and CS/DS sulfotransferases are represented by various isoenzymes, which exhibit fine differences in substrate specificity and are regulated depending on cell type and tissue environment. Because the sulfation patterns of HS and CS/DS chains result of the combined expression of these isoenzymes, the regulation of this biosynthesis machinery could be a way to make tissue and/or cell-specific GAGs with distinct biological functions. (Taylor et al. 2006).

Although many evidences support a potential role of proteoglycans in the functions of macrophages (Clasper et al. 1999; Jones et al. 2000; Wegrowski et al. 2006; Trottein et al. 2009), changes in GAGs biosynthesis during macrophage polarization have not yet been studied. In the current work, we analysed the differential expression of GAGs modifying enzymes as a response to macrophage polarization. We found that M1 and M2 activation drastically modified the profiles of expression of numerous HS and CS/DS sulfotransferases, which was accompanied by the expression of GAGs with distinct structural features. We then tested the ability of macrophage GAGs species to present FGF-2 in an assay of tumor cell proliferation. Altogether, our findings suggest that fine modifications in the GAGs biosynthesis machinery may participate to the plasticity of macrophage functions.

Material and methods

Materials

Recombinant human cytokines (FGF-2, IFN- γ , IL-4 and IL-13) were purchased from Tebu-Bio PeproTech. Antibodies to GAGs epitopes have been described in Deligny et al. (2010) and were kindly provided by Toin Van Kuppevelt (University of Nijmegen, Netherlands). All other chemicals, except where otherwise mentioned, were purchased from Sigma-Aldrich.

Cells

Human citrated venous blood samples were obtained from the local blood transfusion center (Etablissement de Transfusion Sanguine, Lille, France). Following isolation of peripheral blood mononuclear cells 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). The purity of cell populations was assessed by FACS and found > 95 %. Monocytes-derived macrophages (MDM) were obtained by incubating freshly isolated

monocytes (106 cells/mL) in complete RPMI 1640 10 % calf serum (FCS) for 5 days. Macrophage polarization was obtained by culturing MDM for an additional 48 h with 10 ng/mL LPS plus 10 ng/mL IFN- γ for M1 polarization or 10 ng/mL IL-4 plus 10 ng/mL IL-13 for M2 polarization. The human breast carcinoma cell line MDA-MB-231 was obtained from the American Type Cell Culture Collection. Cells were routinely cultured in DMEM medium containing 10% FCS, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, all purchased from Lonza.

Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from 1×10^6 cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel). Reverse transcription was performed from 2 μ g of total RNA by using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific). Synthetic primers for NDST1, NDST2, NDST3, NDST4, HS3ST1, HS3ST2, HS3ST4, HS3ST5 and HS3ST6 were described in Deligny et al. (2010) and for HS2ST1, HS3ST3A, HS3ST3B, HS6ST1, HS6ST2, HS6ST3, D4ST1, C4ST1, C4ST2, C4ST3, UST, C6ST1, C6ST2 and GALNAC4S-6ST in Gotte et al. (2007). Synthetic primers for CXCL10, IL-12, FN1 and CCL18 were designed by using Primer-Blast (NCBI) according to the published cDNA sequences : CXCL10 (NM_001563.3), 5'-CCACGTGTTGAGAT CATTGGC-3' (forward) and 5'-TTCTTGA TGGCCTTCGATTC-3' (reverse) ; IL-12 (NM_000882.3) 5'-ACCAGGTGGAGTTCAA GACC-3' (forward) and 5'-TGGCA CAGTCTCACTGTTGA-3' (reverse) ; FN1 (NM_212482.1), 5'-TGACACTTATGAGCGTC CT-3' (forward) and 5'-AAACACTTCT CAGCTATGGG-3' (reverse) ; CCL18 (NM_002988.2), 5'-AAGAGCTCTGCTGCCT CGTCTA-3' (forward) and 5'-CCTCAGGCA TTCAGCTTCA-3' (reverse). The sequence of amplified fragments was confirmed by sequencing (GATC Biotech). Real-time PCR amplifications were performed using an Mx3000P Multiplex Quantitative PCR system (Stratagene). The transcript of HPRT was used as a control to normalize the expression of genes of interest. Each reaction of PCR consisted of 25 μ l containing 2 μ l of diluted cDNA sample (1:5), 12.5 μ l of Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 1 μ l of forward primer (7.5 μ M for HS2ST1; 22.5 μ M for HS3ST1 and HS3ST2; 15 μ M for all the others), 1 μ l of reverse

primer (7.5 μ M for HS2ST1; 22.5 μ M for NDST4 and HS3ST6; 15 μ M for all the others) (Eurogentec), and 8.5 μ l of water. It also included a non-template negative control to check for primer dimers. The conditions of PCR were as follows: 1 cycle of denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95 $^{\circ}$ C, 30 s at specific temperature of annealing (67 $^{\circ}$ C for NDST4, HS3ST1 and HS3ST4; 68 $^{\circ}$ C for HS3ST6; 60 $^{\circ}$ C for all the others) and 30 s at 72 $^{\circ}$ C. The fluorescence data were measured at the end of each cycle. A melting curve (55–95 $^{\circ}$ C at 1 $^{\circ}$ 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 (Ct), was determined for each sample, and the average Ct of triplicate samples was used for further analysis. The relative quantification of transcripts was calculated as described previously (Pfaffl 2001).

Total GAGs isolation

20×10^6 macrophages were collected, pelleted and suspended in 1 mL of lysis buffer (Tris/HCl 50 mM pH 7.4, 100 mM NaCl, Triton X-100 1%). Pronase E (Merck) was then added to a final concentration of 0.6 mg/mL and the samples were incubated at 50 $^{\circ}$ C for 16 h. Following inactivation of Pronase E for 5 min at 100 $^{\circ}$ C, samples were centrifuged at 10,000 g for 10 min, supernatants were recovered and adjusted at 2 M NaCl. Thereafter, 1 mL of chloroform and 200 μ l of methanol were added, and the samples were mixed vigorously for 15 min. They were centrifuged at 400 g for 10 min and the aqueous phases were recovered. High molecular weight molecules were then precipitated with 9 volumes of cold ethanol overnight at -20 $^{\circ}$ C. The precipitates were pelleted by centrifugation at 10,000 g for 1h and air-dried by using a SpeedVac apparatus to remove traces of ethanol. The samples were then suspended in 200 μ l of buffer (Tris 50 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 6.5), and treated with benzonase and type V neuraminidase from Clostridium perfringens at final concentrations of 1.2 U/mL and 0.1 U/mL, respectively, for 4 h at 37 $^{\circ}$ C. After inactivation of the enzymes and clarification of the samples, GAGs were precipitated with 9 volumes of cold ethanol overnight at -20 $^{\circ}$ C. The precipitates were pelleted and air-dried.

GAGs quantitation by carbazole assay

Purified GAGs were suspended in either heparinase buffer (Tris 20 mM, CaCl₂ 4 mM, NaCl 50 mM, pH 7.9) or chondroitinase buffer (Tris 50 mM, sodium acetate 60 mM, pH 8) and treated with heparinases I, II, III (0.25 mU of each per sample, 24 h at 37 °C) (Iduron) or chondroitinase ABC (25 mU/sample, 2 h at 37 °C). After inactivation of the enzymes and clarification, remaining GAGs were precipitated with 9 volumes of cold ethanol overnight at -20°C. The precipitates were pelleted, air-dried and resuspended in water. The efficacy of the enzymatic digestions was assessed by treating GAGs standard (CS-A, CS-B, CS-C, HS and heparin) at the same enzyme concentrations. Quantitation of GAGs was performed by using a carbazole assay, according to the method developed by Cesaretti (2003) with some modifications. Briefly, 50 µl of serial dilutions of standard GAGs or samples were placed in a 96-well plate. 200 µl of a solution of 25 mM sodium tetraborate in sulfuric acid was added and the plate was heated for 30 min at 80°C. After cooling at room temperature, 50 µl of 0,125 % carbazole in absolute ethanol were added and the plate was heated at 80°C for 30 min. After cooling, absorbances were measured at a wavelength of 550 nm using a Tristar multimode microplate reader LB 941 (Berthold Technologies). Standard curve ranging from 0.04 to 0.5 mg/mL (2 to 25 µg/sample) was done with CS-A. Relative GAGs abundance was normalized to protein content (micro BCA protein assay reagent kit, Pierce Biotechnology).

Analysis of cell immunostaining by flow cytometry
Cell surface CD80 was directly stained with fluorescein-conjugated mouse anti-human CD80 antibody (BD Pharmingen). To this end, cells were incubated with the antibody for 1 h at 4°C in PBS containing 0.5% of bovine serum albumin and rapidly washed with PBS prior analysis. For CD209 staining, cells were first incubated in the same buffer with primary mouse anti-human CD209 antibody (BD Pharmingen), followed by a second incubation with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG antibody. Cell surface GAGs was stained by using phage display-derived vesicular stomatitis virus (VSV)-tagged single-chain antibodies as described in (Deligny et al. 2010). Data were monitored on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) and analysed with CellQuest software.

Western blot analysis of sulfotransferases

Cells (8 x 10⁶ per point) were lysed in 1 mL of lysis buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM

MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 % Triton X-100, 20% (v/v) glycerol, pH 7.2) containing cocktail of protease inhibitor (Roche) for 16 h at 4 °C. The lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4 °C. They were then diluted 10 times with previous buffer without Triton X-100 and glycerol, mixed with 10 mg of adenosine 3',5'-diphosphate-agarose beads and incubated overnight at 4°C. The beads were then washed two times with lysis buffer containing 0.1 % Triton X100. Thereafter, 100 µL of Laemmli buffer was added to the beads and samples were boiled for 10 min. Proteins were then eluted by centrifugation, separated by SDS-PAGE (10 %, w/v) and transferred onto nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell BioScience). Immunoblotting was performed by using antibodies to HS3ST3B, HS3ST2 and C4ST1. 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) fat-free milk and then probed with primary antibodies overnight at 4°C in the same solution. After washing, HRP-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences) were added for 1 h at room temperature. Signals were visualized using the ECL SuperSignal West Femto detection system according to the customer instructions (Thermo Scientific).

Cell Proliferation Assay

The ability of macrophages to modulate proliferation of MDA-MB-231 cells was assessed by co-culture experiments, essentially as described by Jones et al. (2000), with the following modifications. MDA-MB-231 cells were plated at 1.10⁵ cells/mL and incubated overnight in serum-starved medium. Thereafter, an equal volume of culture medium containing M1 or M2 macrophages (1.10⁵ cells/mL) was added to the wells and co-culture samples were incubated for 2-5 days at 37°C in the presence or absence of FGF-2 (10 ng/mL). In some experiments, macrophages were fixed with glutaraldehyde (1% w/v in PBS, pH 7.5) as described in Jones et al. (2000). To evaluate the role of cell-surface GAGs, macrophages were treated with a cocktail of lyases including heparinases I, II and III (1.25 U/mL of each) and chondroitinase ABC (0.75 U/mL), for 2 h at 37°C. Proliferation of cancer cells was measured by CFSE or MTS/PMS assays, according to the instructions of the manufacturers. CFSE-labelling of MDA-MB-231 cells was performed by using the CellTrace CFSE Proliferation kit (Life technologies). Briefly, cells were incubated with

CFSE (5 μ M) in PBS for 15 minutes at 37°C. After washing with pre-warmed medium, MDA-MB-231 cells were incubated for 30 min at 37°C prior the addition of macrophages. After 2-5 days of co-culture, the number of cancer cells was estimated by flow cytometry and data were analysed with the software CellQuest. The proliferation index, which represents the average number of growing cells relative to the initially added cells, was calculated by using FCS Express 4 Plus Research software. For MTS/PMS assays, cell proliferation was measured by using CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega). At the end of incubation, 20 μ L of working solution of MTS/PMS was added to each well (100 μ L) and the reaction was developed at 37 °C for 1 h. The absorbance was measured at 490 nm on a BioTek Epoch microplate reader.

Statistical analysis

Results are representative of at least three independent experiments conducted with MDM obtained from different donors. Statistical significance between the different values was analysed by Student's t-test with a threshold of $P < 0.05$.

Results

Phenotypic characterization of M1 and M2 macrophages

Human primary monocytes-derived macrophages (MDM) were stimulated with LPS/IFN- γ or IL-4/IL-13 in order to obtain polarized macrophages. We confirmed M1 or M2 phenotypes by measuring the expression of specific markers. Typically, M1 polarization can be characterized by up-regulation of CD80 and high production of Th-1 cytokines, such as CXCL10 and IL-12. Conversely, M2 macrophages express DC-SIGN (CD209) at their cell surface and produce high levels of CCL18 and fibronectin 1 (FN1). Accordingly, we found that LPS/IFN- γ stimulation induced a higher expression of CD80 than IL-4/IL-13 treatment. In contrast, DC-SIGN expression was only increased in response to IL-4/IL-13 treatment (Figure 1A). Furthermore, we confirmed that LPS/IFN- γ treatment selectively induced CXCL10 and IL-12 gene expression, while FN1 and CCL18 gene expression was induced in response to IL-4/IL-13 (Figure 1B). The expression of other specific markers, including TNF- α , CCL5, CCL17, CCL22, ALOX15 and CD206, was also evaluated, and further supported our observations (data not shown). Together, these results confirmed that our protocol of in vitro polarization was efficient to

obtain macrophages exhibiting either pro-inflammatory M1 or alternative M2 phenotypes.

Variations of GAGs contents in polarized macrophages

To examine whether macrophage polarization may affect GAGs synthesis, we first quantified the amounts of HS and CS/DS produced in M1 versus M2 macrophages. By using a carbazole assay, we found that the total GAGs content was 1.5-fold lower in M1 macrophages by comparison with M2 macrophages (135 ± 4.7 versus 203 ± 6.7 μ g per mg of protein, respectively). Interestingly, this difference was mainly related to an increase in HS content. Indeed, treatment with heparinases reduced the total GAGs contents to 91 ± 22 μ g per mg of proteins in M1 macrophages and to 116 ± 29 μ g per mg of proteins in M2 macrophages. In reverse experiments, remaining GAGs after chondroitinase ABC treatment were estimated at 54 ± 12 μ g versus 97 ± 22 μ g per mg of proteins in M1 and M2 macrophages, respectively. Therefore, M2 macrophages contain almost twice more HS than M1 macrophages. In contrast, the CS/DS amount appeared to be fairly similar in both types of macrophages (Figure 2A). To further characterize structural features of GAGs expressed at the surface of M1 and M2 macrophages, we also analysed the binding of a panel of anti-GAGs antibodies by flow cytometry (Deligny et al. 2010). AO4B08, which preferentially reacts with HS motifs reactivity of this antibody was almost 8-fold higher with M2 macrophages, indicating that the HS motifs recognized by AO4B08 were selectively increased in response to IL-4/IL-13. RB4Ea12, specific for low sulfated HS, bound similarly to M1 and M2 subtypes, indicating that low sulfated HS motifs were similarly represented. HS4C3, which recognizes highly sulfated HS epitopes containing 3-O-sulfate groups, reacted strongly with both macrophage types, with an almost 1.5 fold higher ability to react with M2 macrophages. Finally, cell staining with IO3H10, which reacts with CS but not DS epitopes, was

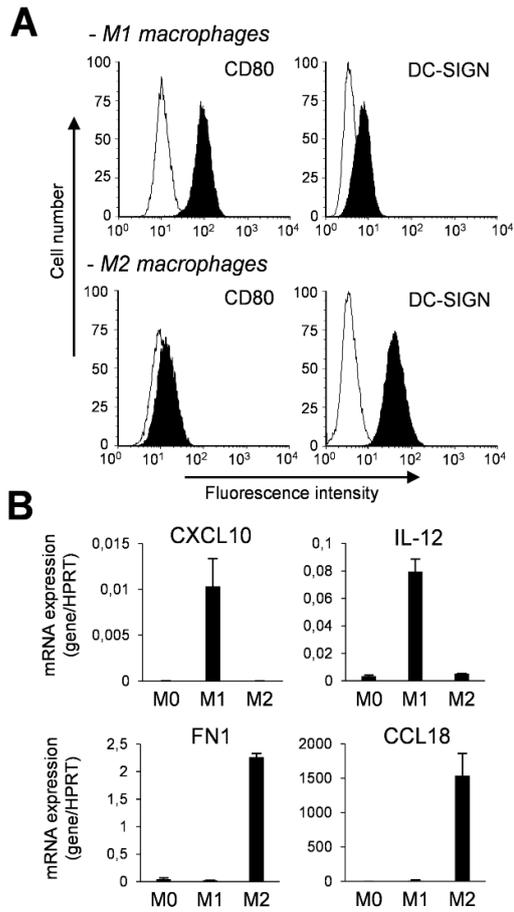


Figure 1 Phenotypic characterization of macrophage polarization. Following activation of MDM for 2 days in the presence of either LPS/IFN- γ or IL-4/IL-13, M1 or M2 polarization was confirmed by evaluating the expression of specific phenotype markers. (A) Cell-surface expression of CD80 (M1 marker) and DC-SIGN (M2 marker) was analysed by flow cytometry with appropriate specific antibodies. Filled histograms represent staining with specific antibodies and open histograms represent negative control obtained with an irrelevant antibody. Representative results of four independent experiments conducted with different donors are shown. (B) Following extraction of total RNA and reverse transcription, the expression of CXCL10, IL-12 (markers M1), FN1 and CCL18 (markers M2) was analysed by real-time PCR, as described in the "Materials and Methods" section. Relative mRNA abundance in non-activated (M0), M1 and M2 macrophages was normalized to endogenous HPRT transcript. Data are means \pm SD from six independent experiments conducted with MDM from different donors.

found higher in M1 macrophages (Figure 2B). Although the reactivity of anti-GAGs antibodies was not discriminant enough to define GAGs sequences, these results are informative of the subtle changes in the structural features of every type of cell surface GAGs during macrophage polarization.

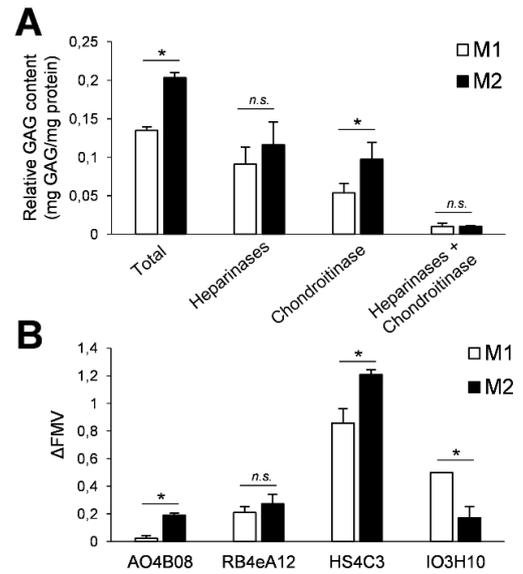


Figure 2 Modification of GAGs features after macrophage polarization. Following polarization of macrophages, differences in GAGs contents and structural features between M1 and M2 subtypes were analysed by carbazole assay and cell surface immunostaining with anti-GAGs antibodies. (A) GAGs were extracted from fully differentiated M1 and M2 macrophages and either untreated (total GAGs) or treated with heparinases (to obtain CS/DS) and/or chondroitinase ABC (to obtain HS). GAGs were then quantified by carbazole assay, as described in the "Materials and Methods" section. Relative GAGs abundance was normalized to protein content. Data are mean \pm SD from three independent experiments conducted with MDM from different donors. (B) Cells were immunostained with VSV-tagged antibodies to HS and CS epitopes or isotype control. After incubation with mouse anti-VSV and fluorescein-conjugated anti-mouse antibodies, fluorescence was detected by flow cytometry. Data are expressed as variation of fluorescence mean value (Δ FMV) and correspond to means \pm S.D. from at least three separate experiments obtained with macrophages from different donors. (*, significant difference compared to isotype control, $p < 0.05$; n.s., not significant).

Expression of GAGs sulfotransferases in polarized macrophages

In the following experiments, we analysed whether difference in GAGs structure between M1 and M2 macrophages could be related to changes in the expression of sulfotransferases. In HS, the removal of acetyl groups from GlcNAc residues followed by sulfation of amino groups is a prerequisite for subsequent modifications. This crucial reaction can be catalysed by four isoenzymes, NDST1, NDST2, NDST3 and NDST4, which display subtle differences in enzymatic activity. Further modifications of HS include the addition of sulfate groups at C2 of

uronic acid and at C6 and/or at C3 of glucosamine (GlcN). Residues C2 sulfation is catalysed by a single enzyme, termed HS2ST1. In contrast 6-O-sulfation can be catalysed by three isoenzymes (HS6ST1, HS6ST2 and HS6ST3) and 3-O-sulfation by seven isoenzymes (HS3ST1, HS3ST2, HS3ST3A, HS3ST3B, HS3ST4, HS3ST5 and HS3ST6). Sulfation of CS/DS is catalysed by eight sulfotransferases. Four isoenzymes are involved in the reaction of 4-O-sulfation. C4ST1 (chondroitin 4-O-sulfotransferase-1), C4ST2 and C4ST3 are preferably acting on GalNAc residues in CS, whereas D4ST1 (dermatan 4-O-sulfotransferase-1) is involved in 4-O-sulfation of GalNAc residues in DS. There are also three enzymes involved in the reaction of 6-O-sulfation: two of them, denoted C6ST1 and C6ST2, add sulfate groups to the C6 of GalNAc residues, while the third, termed GalNAc4S-6ST (CHST15), specifically catalyses 6-O-sulfation of 4-O-sulfated GalNAc residues. At last, uronyl-2-O-sulfotransferase (UST) specifically transfers a sulfate group to the C2 of either GlcUA or IdoUA residues in CS/DS chains (Mikami et al. 2013). The expression of sulfotransferases was first assessed by qRT-PCR in non-activated macrophages (M0) (Figure 3). We found that M0 macrophages expressed mRNA encoding 11 HS sulfotransferases, the best expressed being NDST1, NDST2, HS2ST, HS6ST1, HS3ST1 and HS3ST2. By comparison, HS6ST2, HS6ST3, HS3ST3A, HS3ST3B and HS3ST6 were weakly expressed. NDST3, NDST4, HS3ST4 and HS3ST5 were not detected. With the exception of C6ST1, all the sulfotransferases modifying CS/DS are detected in M0 macrophages. These experiments were conducted with MDM from at least six different healthy donors. Although some inter-individual variations could be observed, the profiles of expression of HS and CS/DS sulfotransferases resembled each other, suggesting that non-activated macrophages express cell surface GAGs with similar sulfation patterns. Levels of expression of each isoenzyme were then measured in the cells from the same donors upon M1 or M2 polarization. As shown in Table 1, marked variations in mRNA levels of 6/15 HS sulfotransferases could be distinguished in M1 and M2 subtypes by comparison to non-activated M0 macrophages. For example, a 2-fold increase in the expression of NDST1 and NDST2 was observed following M1 activation, while the level of HS2ST was decreased by a factor of 3. However, the most dramatic changes were

observed for mRNA encoding HS3ST isoforms. Indeed, the levels of HS3ST1 and HS3ST2 were decreased by 15 and 30 fold, respectively, while a 20-fold increase in the expression of HS3ST3B was observed in M1 macrophages. In M2 macrophages, the expression of HS2ST was increased by a factor of 2, while HS3ST3B was barely detected. Regarding CS/DS sulfotransferases, we found marked modifications in the expression of 3/8 isoenzymes. A 3-fold increase in the expression of C4ST1 was observed following M1 polarization, which was accompanied by an 8-fold decrease in the expression of C4ST3. In contrast, the levels of C4ST3 and UST expression were increased by factors of 2 and 3.5 in M2 macrophages, respectively.

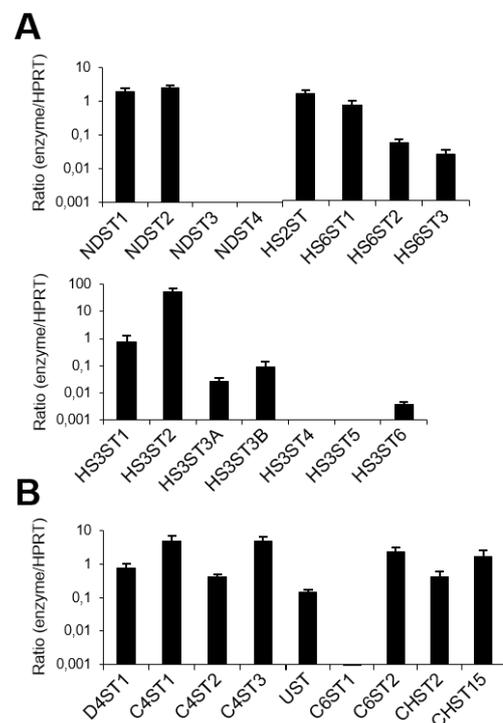


Figure 3 Expression of mRNA encoding HS sulfotransferases in non-activated (M0) macrophages. Following reverse transcription of RNA extracted from non-activated MDM, the level of expression of HS (A) and CS/DS (B) sulfotransferases was quantified by real time PCR. Relative transcript abundance was normalized to endogenous control HPRT mRNA. Data are means \pm SD and were obtained with MDM from six different donors

In an attempt to emphasize the phenotypic changes in the biosynthesis machinery of GAGs, we then compared the expression of sulfotransferases in M2 versus M1 macrophages (Table 1 right column and Figure 4). In addition to NDST1 and NDST2 that were 2-fold more expressed in response to pro-inflammatory

stimuli, we found that the expression of HS3ST3B was significantly more expressed (65-fold) in M1 versus M2 subtypes. In contrast, HS3ST1 and HS3ST2 were 8- and 40-fold more expressed in M2 macrophages ($p < 0.05$), thus indicating that HS3ST isoenzymes may be used as specific markers of macrophage polarization.

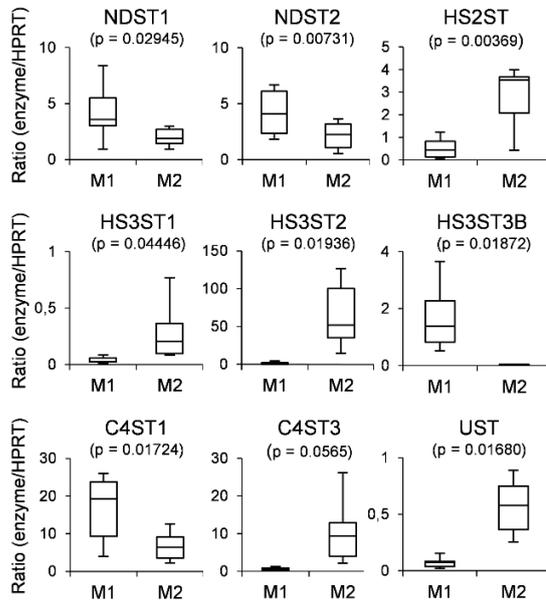


Figure 4. Variations in the expression of HS and CS/DS sulfotransferases in polarized macrophages. MDM were activated in the presence of either LPS/IFN- γ or IL-4/IL-13 for 2 days in order to obtain fully polarized M1 and M2 macrophages, respectively. Following extraction of total RNA and reverse transcription, variations in the levels of expression of sulfotransferases were quantified by real time PCR. Relative transcript abundance was normalized to endogenous HPRT transcript. Variations in the expression of mRNA encoding NDST1, NDST2, HS2ST, HS3ST1, HS3ST2, HS3ST3B, C4ST1, C4ST3 and UST are represented as box-and-whiskers plots showing range and quartiles. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, with a line at the median (the 50th percentile). The whiskers extend above and below the boxes to show the highest and lowest values. Data are from six experiments performed independently with cells from six different donors. Statistical significance was calculated with the paired Student's t-test and indicated for each enzyme. In all experiments, statistical significance was determined using the Student's t-test, and p-values < 0.05 were considered as significant

We found also a marked phenotypic difference in the expression of mRNA encoding C4ST isoenzymes. A 2.5-fold higher expression of C4ST1 was observed in M1 macrophages, while M2 polarization was characterised by a 20-fold higher expression of C4ST3. Finally, we showed

that HS2ST1 and UST, which are involved in the C2-sulfation of HS and CS/DS respectively, were 5-fold more expressed in M2 versus M1 subtypes, suggesting that high 2-O-sulfation of GAGs may be a specific hallmark of M2 macrophages.

Sulfotransferases protein expression

In order to confirm that variations in gene expression led to changes in the production of corresponding enzymes, we performed Western blot experiments using cell lysates from M1 and M2 macrophages. We focused on HS3ST2, HS3ST3B and C4ST1, which were the most differentially expressed following macrophage polarization. As shown in Figure 5, we found that HS3ST3B and C4ST1 were immunostained in lysates from both subtypes of macrophages, with a higher expression in M1 macrophages. In contrast, the expression of HS3ST2 was only detected in lysate from M2 macrophages. All together, these results confirm that differential gene expression measured by qPCR translate into differential expression of the corresponding proteins which can, in turn, finely modify GAGs sulfation in a polarization dependent manner.

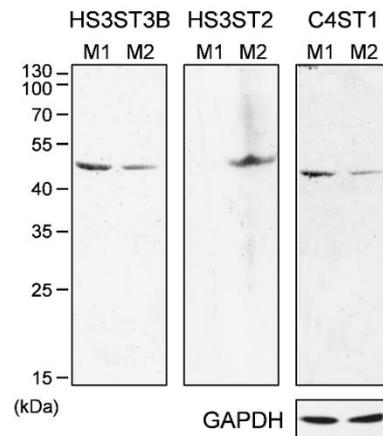


Figure 5 Detection of HS3ST2, HS3ST3B and C4ST1 in polarized macrophages. After polarization, M1 and M2 macrophages from the same donor were lysed and proteins were separated by SDS-PAGE. Variations in HS3ST2, HS3ST3B and C4ST1 in both macrophage subtypes was analysed by Western-Blot as described in "Materials and Methods". Parallel immunoblotting with anti-GAPDH confirmed equal loading of the samples. Representative results from three independent experiments are shown.

Presentation of FGF-2 by GAGs expressed at the surface of polarized macrophages

Previous works reported that macrophages interact with and present FGF-2 in a form that transactivates receptor-bearing cancer cells (Clasper et al. 1999; Jones et al. 2000). These results were consistent with a role of macrophage cell surface GAGs in the delivery of sequestered

ligands to their target cells. However, the relevance of M1/M2 polarization was not addressed in these studies. To test the ability of polarized macrophages to present FGF-2 to cancer cells, we used the human breast cancer cell line MDA-MB-231. Although these cells express the cognate receptor of FGF-2, they are poorly responsive to the growth factor due to the low capability of presentation of their endogenous GAGs (Delehedde et al. 1996).

First, we analysed the effect of polarized macrophages on the proliferation of co-cultivated MDA-MB-231 cells. After 5 days of incubation, the number of cancer cells was counted by flow cytometry and the values were compared to the number of initially added cells (0.1×10^6 per sample) (Figure 6A). We found that removal of serum in culture medium potentially reduced the growth of MDA-MB-231 cells, as evidenced after cell counting (0.11×10^6 cells versus 0.41×10^6 cells in the presence of serum). Co-culture with M2 macrophages had no cytotoxic effect but rather enhanced cell proliferation in absence of serum (0.27×10^6 cells). In contrast, the addition of M1 macrophages had no significant effect on MDA-MB-231 cells in culture. This observation was however not surprising since M2 macrophages have been reported to release factors that promote cell growth and/or survival (Liu et al. 2013). We then analysed the role of M2 macrophages in the promotion of FGF-2-dependent proliferation of CFSE-labelled MDA-MB-231 cells. As shown in Figure 6B, FGF-2 alone was poorly efficient to stimulate the proliferation of serum-starved cells. The addition of heparin induced a 1.5-fold increase in cell growth by comparison with FGF-2 alone, thus confirming that GAGs-mediated presentation of the growth factor is required to transactivate the cognate receptors on MDA-MB-231 cells. Importantly, we found that co-culture with M2 macrophages also potentiated the activity of FGF-2 ($\times 1.4$ by comparison with FGF-2 alone). In contrast, the addition of M1 macrophages had no significant enhancing effect on FGF-2 induced cell proliferation (data not shown). This indicates that M2 macrophages could be efficient promoters of FGF-2-dependent proliferation of adjacent cancer cells. To further explore this function, we reproduced the experiments with glutaraldehyde-fixed M2 macrophages. Proliferation of MDA-MB-231 cells was measured by using CFSE (Figure 6C) and MTS/PMS assays (Figure 6D). Fixed macrophages had no significant effect on cell growth, supporting the hypothesis that the

enhancing effect of M2 macrophages in co-culture may be related to the release of promoting factors for cancer cell growth and/or survival. In contrast, proliferation of MDA-MB-231 cells was significantly increased when FGF-2 was added in the presence of fixed macrophages ($\times 1.4$ at day 5 when compared to FGF-2 alone). Moreover, the involvement of GAGs chains in this process was clearly demonstrated by treatment of fixed macrophages with GAGs lyases, which potentially reduced FGF-2 induced cell proliferation. In summary, our results show that GAGs of M2 macrophages efficiently present FGF-2 in a form that enhances proliferation of adjacent cells, which may play an important role in the promotion of tumor cell growth.

Discussion

Due to multiple binding sites within their polymeric structures, GAGs are critical regulators of many extracellular messengers (e.g. chemokines or growth factors). For example GAGs can cross-present growth factors to their receptors, thus potentiating their effect. GAGs have also the ability to attract and concentrate these messengers, thus acting on their bioavailability. Consequently, GAGs are involved in many cellular processes, including proliferation, differentiation, adhesion and/or migration. A number of inflammatory factors and cytokines have been reported to interact with cell surface GAGs to target leukocyte subsets, which could play an important role in the regulation of immune responses. However, little is known about the consequences of various inflammatory stimuli on GAG biosynthesis. In the current work, we have then explored the effect of differential macrophage polarization on the biosynthesis of GAGs. To this end, macrophages derived from peripheral blood monocytes were polarized in the presence of either LPS/IFN- γ or IL-4/IL-13 combinations, in order to obtain pro-inflammatory M1 or alternative M2 subpopulations, respectively. Full macrophage polarization was confirmed by analysing the expression of specific markers of M1 and M2 phenotypes.

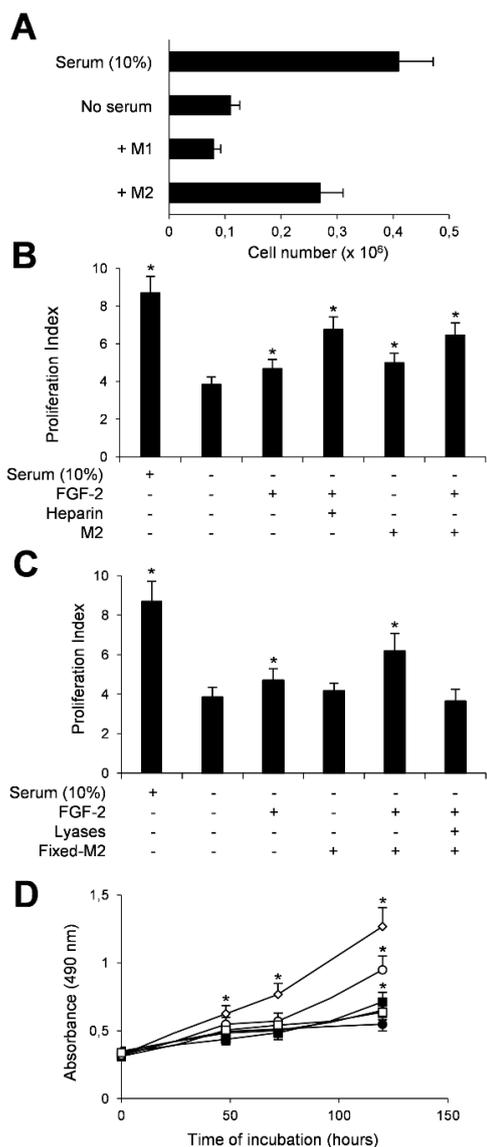


Figure 6 Presentation of FGF-2 by GAGs expressed at the surface of polarized macrophages. The capability of polarized macrophages to present FGF-2 to adjacent tumor cells was tested in a model of co-culture with the human breast cancer cell line MDA-MB-231. (A) Fully differentiated M1 or M2 macrophages and MDA-MB-231 cells were co-cultured without serum at a ratio 1/1 in the absence or presence of FGF-2 (10 ng/mL). A control of proliferation was performed by culturing MDA-MB-231 cells in the presence of 10% of serum. After 5 days of culture, macrophages were stained with a PE-labelled anti-CD14 antibody for exclusion and the number of MDA-MB-231 cells was calculated by flow cytometry. Data are means \pm SD of at least three separate experiments obtained with macrophages from different donors. (B) CFSE-labelled MDA-MB-231 cells were cultured with FGF-2 (10 ng/ml), heparin (100 ng/ml) and/or M2 macrophages at a ratio 1/1. After 5 days of culture, the intensity of CFSE signal in tumor cells was analysed by flow cytometry after exclusion of macrophages with PE-labelled anti-CD14 antibody. Each bar of histograms represents mean \pm SD of the proliferation indexes obtained from three distinct experiments. (C) Prior

co-culture with CFSE-labelled MDA-MB-231 cells, M2 macrophages were fixed with glutaraldehyde and either treated or not with GAGs lyases (heparinases I, II, III: 1.25 mU/ml of each; chondroitinase ABC: 0.75 U/ml). After 5 days of culture with FGF-2 (10 ng/ml) and/or glutaraldehyde-fixed M2 macrophages (fixed-M2), the intensity of CFSE signal in MDA-MB-231 cells was analysed by flow cytometry. Data are means \pm SD of proliferation indexes obtained from at least three distinct experiments. (D) MDA-MB-231 cells were cultured without serum for 48, 72 or 120 hours in the absence (filled circle) or presence of FGF-2 (filled square), glutaraldehyde-fixed M2 macrophages (filled diamond) or both (empty circle). The role of cell surface GAGs was determined by treating fixed M2 macrophages with GAGs lyases prior addition to cell culture (empty square). Control of proliferation was performed by culturing MDA-MB-231 cells in the presence of 10% of serum (empty diamond). At the end of each time of incubation, 20 μ L MTS/PMS solution was added to the well (100 μ L) and the intensity of the reaction was measured at 490 nm. Points are means \pm SD from three separate experiments obtained with macrophages from different donors. (*, significantly different by comparison with MDA-MB-231 cells cultured in the absence of serum, $p < 0.05$).

Using a quantitative colorimetric assay, we found that GAG content was higher in M2 macrophages and contained almost twice more HS than M1 macrophages. This observation was consistent with previous reports showing that IL-4 increased GAG synthesis in human fibroblasts (Wegrowski et al. 1995; Hashimoto-Uoshima et al. 2002) and mouse macrophages (Ruffell et al. 2011). Interestingly, these past studies also reported that GAG sulfation was increased in response to IL-4 stimulation. Sulfation patterns may vary considerably among GAG species. This has been linked to the action of specific sulfotransferases and to the relative expression of these enzymes, which depends on cell type and environment. To gain information on the structural features of GAGs in M1/M2 polarized macrophages, we analysed the expression of HS and CS/DS sulfotransferases. Non-activated macrophages expressed 18 sulfotransferases involved in cell surface GAG biosynthesis, 11 of them acting specifically on HS species. We then observed that macrophage polarization altered the levels of expression of these enzymes, with a dramatic change in the expression of 9 sulfotransferases between M1 and M2 macrophages. The most striking difference was related to the expression of HS3STs. For example, HS3ST3B was strongly induced in M1 macrophages, indicating that the expression of this isoenzyme is up-regulated by pro-inflammatory stimuli. In contrast, HS3ST2 was highly expressed in M2 macrophages, while it was barely detected in M1 macrophages. Both

isoenzymes have been extensively studied for their role in providing HS binding sites for the glycoprotein gD of HSV-1, and they were reported to catalyse the same reaction of 3-O-sulfation in vitro (Thacker et al. 2013). The biological functions of GAGs rely on their ability to create specific interaction with a large repertoire of proteins. Because the structure of GAGs is a consequence of cell-type specific expression of sulfotransferases, the differential expression of HS3STs in polarized macrophages suggests that these isoenzymes may be involved in the synthesis of 3-O-sulfated HS with distinct structural features and functions. Concerning CS/DS sulfating enzymes, a marked phenotypic difference in the expression of C4ST1 and C4ST3 was observed, also suggesting that both isoenzymes may be involved in the synthesis of distinct 4-O-sulfated species in polarized macrophages. Finally, we found that M2 macrophages expressed high levels of both HS and CS/DS 2-O-sulfotransferases, i.e. HS2ST1 and UST. These results suggest that M2 macrophages are able to produce higher levels of 2-O-sulfated GAGs than M1 macrophages.

The sulfation pattern of cell surface GAGs was also assessed by the use of a panel of anti-GAG antibodies, as described in Deligny et al. (2010). HS4C3, which preferentially reacts with 3-O-sulfated HS sequences (van Kuppevelt et al. 1998; Smits et al. 2006; Ten Dam et al. 2006), strongly stained M1 and M2 macrophages, which is in accordance with the high expression of HS3STs in both subsets of macrophages. However, cell immunostaining was significantly weaker with M1 macrophages, indicating that 3-O-sulfated epitopes were less represented in these cells when compared to M2 macrophages. This difference could be partly linked to the amount of HS, which is twice weaker in M1 than in M2 macrophages (Figure 2). Alternatively, difference in cell immunostaining could be linked to difference in the reaction of 3-O-sulfation. Although the expression of HS3ST3B was increased in M1 macrophages compared to the low levels detected in M2 macrophages, HS3ST2 was strongly over-expressed in M2 macrophages but drastically repressed in M1 macrophages, as evidenced by Western blot experiments (Figure 5). Such differences in the expression of HS3ST isoenzymes may in turn led to a higher density of 3-O-sulfate groups in HS of M2 macrophages. AO4B08 was described to recognize highly sulfated HS epitopes containing an internal IdoUA2S residue (Dennissen et al. 2002; Smits et

al. 2006). We found that the reactivity of this antibody was 8-fold higher with M2 versus M1 macrophages. This is consistent with the 5-fold higher expression of HS2ST in these cells by comparison with M1 macrophages. Finally, we used IO3H10, which was reported to exhibit a broad reactivity toward 4-O, 6-O and 4,6-O-sulfated CS epitopes (Smetsers et al. 2004). Intriguingly, this antibody was efficient to stain M1 macrophages, while it was 3-fold less reactive with M2 macrophages. This could not be due to differences in amount of CS/DS expressed by both subsets, which were found similar (Figure 2). Furthermore, the main difference in the CS/DS synthesis machinery between both subtypes concerned the 2-O-sulfotransferase UST, which was found increased in M2 macrophages. Therefore, it could be postulated that high density of 2-O-sulfates reduced the reactivity of IO3H10 to CS/DS. Overall, immuno-characterisation of GAGs in polarized macrophages fitted well with the profile of expression of sulfotransferases. These sulfation patterns driven by M1/M2 polarization might therefore bear some functional specialization involved in macrophage physiological functions.

To address this issue, we chose to work within the scope of cancer immunity. It is now well-known that macrophages can infiltrate solid tumors and participate to the formation of a tolerant environment beneficial for cancer cell growth and expansion. Accumulating data now support the concept that M2 rather than M1 macrophages could be involved in this process. M2 macrophages have poor antigen presenting ability and weak cytotoxic activity. Conversely, they produce high levels of soluble anti-inflammatory factors that suppress immune function while stimulating cancer cell proliferation. For example, M2 polarized macrophages were shown to promote pancreatic cancer cell growth and/or survival (Liu et al. 2013). In parallel, it was previously reported that GAGs present at the surface of activated macrophages were capable to present FGF-2 and to induce proliferation of a fibroblast cell line lacking endogenous HSPGs (Clasper et al. 1999; Jones et al. 2000). However, the distinction between M1 and M2 macrophages was not addressed in these works. Here we used the human breast carcinoma cell line MDA-MB-231 as a model to test the presentation of FGF-2 by GAGs of polarized macrophages. Although MDA-MB-231 cells express the cognate receptor of FGF-2, they are devoid of GAG with high-affinity binding sequences for FGF-2 (Delehedde

et al. 1996). Accordingly, we confirmed that these cells are poorly responsive to FGF-2 when the growth factor is simply added to the culture medium. In contrast, co-culture of MDA-MB-231 cells with M2 macrophages resulted in significant FGF-2 induced cancer cell proliferation. This M2-mediated effect was dependent on the presentation of FGF-2 by M2 cells since fixed macrophages still potentiated the growth factor effect on MDA-MB-231 cells. It was also dependent on GAGs integrity, as demonstrated by GAG lyase treatments. Taken together, our results demonstrate the ability of M2 GAGs expressed at the membrane of M2 macrophages to cross present exogenous FGF-2 to adjacent cancer cells and promote their growth. The minimal HS sequence supporting FGF-2 binding was identified as a decasaccharide containing N- and 2-O-sulfo groups, while additional 6-O-sulfo groups are required for interaction with the cognate receptor (Guimond et al. 1993). In the current works, we found that the expression of 6-OSTs modifying either HS or CS/DS was not significantly modified by macrophage polarization. Conversely, HS2ST and UST were over-expressed in M2 macrophages, suggesting that the reaction of 2-O-sulfation of HS and CS/DS was increased as a response of alternative polarization. These data could explain M2 macrophages are efficient cells to present FGF-2 to adjacent cancer cells.

Collectively, our results show that macrophage polarization is accompanied by a profound reorganization of the machinery of GAG-modifying enzymes, which in turn can lead to change in the structural features of cell-surface GAGs. These findings suggest that fine modifications in GAG biosynthesis may participate to the plasticity of macrophage functions, as demonstrated herein in the context of cancer progression.

Funding

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Université Lille 1 Sciences et Technologies, France.

Acknowledgments

We are grateful to Toin van Kuppevelt (Department of Matrix Biochemistry, Nijmegen Center for Molecular Life Sciences, Nijmegen, The Netherlands) for the generous gift of anti-GAGs antibodies.

Abbreviations

C4ST, chondroitin 4-O-sulfotransferase
 C6ST, chondroitin 6-O-sulfotransferase
 CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester

CHST, carbohydrate sulfotransferase
 CS, chondroitin sulfate;
 D4ST, dermatan 4-O-sulfotransferase
 DS, dermatan sulfate;
 FCS, fetal calf serum
 FGF-2, fibroblast growth factor 2;
 FN1, fibronectin 1;
 GAGs, glycosaminoglycans;
 HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
 HS, heparan sulfate;
 HS2ST, heparan sulfate 2-O-sulfotransferase
 HS3ST, heparan sulfate 3-O-sulfotransferase
 HS6ST, heparan sulfate 6-O-sulfotransferase
 IdoUA, L-iduronic acid;
 IFN- γ , interferon- γ
 IL-1 β , 4, 6, 10, 12, 13, interleukin 1 β , 4, 6, 10, 12, 13;
 LPS, lipopolysaccharide;
 MDM, monocyte derived macrophage;
 MTS/PMS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium / phenazine methosulfate
 NDST, N-deacetylase/N-sulfotransferase;-CSF
 RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction
 siRNA, small interfering RNA
 UST, uronyl-2-sulfotransferase
 VSV, vesicular stomatitis virus
 Δ FMV, variation of fluorescence mean value

References

- Biswas SK, Mantovani A. 2012. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab.* 15:432–437.
- Celie JWAM, Beelen RHJ, van den Born J. 2009. Heparan sulfate proteoglycans in extravasation: assisting leukocyte guidance. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14:4932–4949.
- Cesaretti M. 2003. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydr. Polym.* 54:59–61.
- Clasper S, Vekemans S, Fiore M, Plebanski M, Wordsworth P, David G, Jackson DG. 1999. Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action. *J. Biol. Chem.* 274:24113–24123.
- Delehedde M, Deudon E, Boilly B, Hondermarck H. 1996. Heparan sulfate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity in human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 229:398–406.
- Deligny A, Denys A, Marcant A, Melchior A, Mazurier J, van Kuppevelt TH, 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.
- Dennissen MABA, Jenniskens GJ, Pieffers M, Versteeg EMM, Petitou M, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. 2002. Large, tissue-regulated domain

- diversity of heparan sulfates demonstrated by phage display antibodies. *J. Biol. Chem.* 277:10982–10986.
- Esko JD, Selleck SB. 2002. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* 71:435–471.
- Gordon S, Martinez FO. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593–604.
- Gotte M, Spillmann D, Yip GW, Versteeg E, Echtermeyer FG, van Kuppevelt TH, Kiesel L. 2007. Changes in heparan sulfate are associated with delayed wound repair, altered cell migration, adhesion and contractility in the galactosyltransferase I (ss4GalT-7) deficient form of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 17:996–1009.
- Guimond S, Maccarana M, Olwin BB, Lindahl U, Rapraeger AC. 1993. Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4. *J. Biol. Chem.* 268:23906–23914.
- Hashimoto-Uoshima M, Noguchi K, Suzuki M, Murata A, Yanagishita M, Ishikawa I. 2002. Effects of interleukin-4 on proteoglycan accumulation in human gingival fibroblasts. *J. Periodontol Res.* 37:42–49.
- Jones M, Tussey L, Athanasou N, Jackson DG. 2000. Heparan sulfate proteoglycan isoforms of the CD44 hyaluronan receptor induced in human inflammatory macrophages can function as paracrine regulators of fibroblast growth factor action. *J. Biol. Chem.* 275:7964–7974.
- Kreuger J, Kjellén L. 2012. Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 60:898–907.
- Van Kuppevelt TH, Dennissen MA, van Venrooij WJ, Hoet RM, Veerkamp JH. 1998. Generation and application of type-specific anti-heparan sulfate antibodies using phage display technology. Further evidence for heparan sulfate heterogeneity in the kidney. *J. Biol. Chem.* 273:12960–12966.
- Liu C-Y, Xu J-Y, Shi X-Y, Huang W, Ruan T-Y, Xie P, Ding J-L. 2013. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab. Invest.* 93:844–854.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177:7303–7311.
- Mikami T, Kitagawa H. 2013. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1830:4719–4733.
- Mortier A, Van Damme J, Proost P. 2012. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol. Lett.* 145:2–9.
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8:958–969.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Ruffell B, Poon GFT, Lee SSM, Brown KL, Tjew S-L, Cooper J, Johnson P. 2011. Differential use of chondroitin sulfate to regulate hyaluronan binding by receptor CD44 in Inflammatory and Interleukin 4-activated Macrophages. *J. Biol. Chem.* 286:19179–19190.
- Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. 2011. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Smetsers TFCM, van de Westerloo EMA, ten Dam GB, Overes IM, Schalkwijk J, van Muijen GNP, van Kuppevelt TH. 2004. Human single-chain antibodies reactive with native chondroitin sulfate detect chondroitin sulfate alterations in melanoma and psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 122:707–716.
- Smits NC, Lensen JFM, Wijnhoven TJM, Ten Dam GB, Jenniskens GJ, van Kuppevelt TH. 2006. Phage display-derived human antibodies against specific glycosaminoglycan epitopes. *Methods Enzymol.* 416:61–87.
- Taylor KR, Gallo RL. 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20:9–22.
- Ten Dam GB, Kurup S, van de Westerloo EMA, Versteeg EMM, Lindahl U, Spillmann D, van Kuppevelt TH. 2006. 3-O-sulfated oligosaccharide structures are recognized by anti-heparan sulfate antibody HS4C3. *J. Biol. Chem.* 281:4654–4662.
- Thacker BE, Xu D, Lawrence R, Esko JD. 2013. Heparan sulfate 3-O-sulfation: A rare modification in search of a function. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*
- Trottein F, Schaffer L, Ivanov S, Paget C, Vendeville C, Cazet A, Groux-Degroote S, Lee S, Krzewinski-Recchi M-A, Faveeuw C, et al. 2009. Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Glycoconj. J.* 26:1259–1274.
- Wegrowski Y, Milard A-L, Kotlarz G, Toulmonde E, Maquart F-X, Bernard J. 2006. Cell surface proteoglycan expression during maturation of human monocytes-derived dendritic cells and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 144:485–493.
- Wegrowski Y, Paltot V, Gillery P, Kalis B, Randoux A, Maquart FX. 1995. Stimulation of sulphated glycosaminoglycan and decorin production in adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin-4. *Biochem. J.* 307 (Pt 3):673–678.
- Zhang L. 2010. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 93:1–17.

Table I Analysis of the expression of HS and CS/DS sulfotransferases in non-activated (M0), pro-inflammatory (M1) and alternative (M2) macrophages. The relative expression of mRNA encoding sulfotransferases was normalized with the transcript of HPRT. Data are expressed as the mean values from six different donors. n.d.: not detectable

| Gene name | Gene symbol | M1 | M2 | M1:M2 ratio |
|--|-------------|-------|-------|-------------|
| Heparan sulfate | | | | |
| N-deacetylase/N-sulfotransferase 1 | NDST1 | 4,243 | 1,983 | 2,14 |
| N-deacetylase/N-sulfotransferase 2 | NDST2 | 4,211 | 2,153 | 1,96 |
| N-deacetylase/N-sulfotransferase 3 | NDST3 | nd | nd | \ |
| N-deacetylase/N-sulfotransferase 4 | NDST4 | nd | nd | \ |
| Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 1 | HS3ST1 | 0,044 | 0,361 | 0,12 |
| Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 2 | HS3ST2 | 1,654 | 65,20 | 0,03 |
| Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 3A | HS3ST3A | 0,027 | 0,027 | 0,98 |
| Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 3B | HS3ST3B | 1,692 | 0,026 | 65,4 |
| Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 4 | HS3ST4 | nd | nd | \ |
| Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 5 | HS3ST5 | nd | nd | \ |
| Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 6 | HS3ST6 | 0,002 | 0,002 | 0,99 |
| Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase | HS2ST | 0,529 | 2,808 | 0,19 |
| Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1 | HS6ST1 | 0,621 | 1,189 | 0,52 |
| Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2 | HS6ST2 | 0,058 | 0,063 | 0,92 |
| Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3 | HS6ST3 | 0,029 | 0,017 | 1,75 |
| Chondroitin sulfate | | | | |
| Dermatan 4-O-sulfotransferase 1 | D4ST1 | 0,846 | 0,590 | 1,43 |
| Chondroitin 4-O-sulfotransferase 1 | C4ST1 | 16,61 | 6,719 | 2,47 |
| Chondroitin 4-O-sulfotransferase 2 | C4ST2 | 0,455 | 0,616 | 0,74 |
| Chondroitin 4-O-sulfotransferase 3 | C4ST3 | 0,589 | 11,66 | 0,05 |
| Uronyl-2-O-sulfotransferase | UST | 0,097 | 0,567 | 0,17 |
| Chondroitin 6-O-sulfotransferase 1 | C6ST1 | 0,001 | 0,000 | 1,21 |
| Chondroitin 6-O-sulfotransferase 2 | C6ST2 | 3,393 | 2,977 | 1,14 |
| N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase | CHST15 | 1,355 | 1,022 | 1,33 |

III. Résultats complémentaires

La polarisation des macrophages entraîne une profonde modification de l'expression des sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse des GAGs. De nombreux mécanismes pourraient être à l'origine de ce phénomène. Il a en effet été montré que l'activation classique ou alternative des macrophages est contrôlée en partie par l'activation de certains facteurs de transcription, ainsi que par des mécanismes épigénétiques. Les modifications d'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse des GAGs seraient donc contrôlées par ce type de mécanismes. Nous avons mis en évidence une régulation différentielle de six sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse des HS et de trois agissant sur les CS. Dans le but de mieux comprendre ces mécanismes, nous avons entrepris d'analyser les sites de fixation putatifs de plusieurs facteurs de transcription sur les promoteurs des gènes codant pour ces neuf sulfotransférases. Pour cette étude, les séquences promotrices putatives ont été obtenues sur le site BIOBASE et vérifiées sur Ensembl. L'analyse a été effectuée avec le logiciel Match utilisant la base de données TRANSFAC, sur 2000 pb avant et 1000 pb après le site d'initiation de la transcription. Nous nous sommes limités à la recherche des sites connus pour réguler la polarisation des macrophages, et dont les scores de similarité sont supérieurs à 0,95.

Ce travail nous a permis de montrer que les promoteurs des gènes codant pour les neuf sulfotransférases présentent des sites de fixation putatifs pour des facteurs de transcription impliqués dans la polarisation des macrophages. En effet, pour chacun d'entre eux, plus d'une vingtaine de sites ont pu être mis en évidence. La grande majorité d'entre eux sont des sites de fixation pour des facteurs de transcription activés lors de l'activation M1 (Figure 26).

Ces résultats ne sont pas surprenants puisque les plus grandes variations d'expression des sulfotransférases ont lieu lors de l'activation M1. Ainsi les gènes *NDST1*, *NDST2*, *HS3ST3B1* et *C4ST1* ont leur expression augmentée lors de l'activation M1, alors que les gènes *HS2ST1*, *HS3ST1*, *HS3ST2*, *C4ST3* ET *UST* sont réprimés. Cela suggère que les facteurs de transcription activés lors de la polarisation M1 peuvent selon le contexte cellulaire agir positivement ou négativement sur l'expression des sulfotransférases. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été décrit pour d'autres gènes exprimés par les macrophages (Molawi et al., 2013). Il a ainsi été mis en évidence que le facteur STAT1 est indispensable à l'expression de certains gènes pro-inflammatoires dans les macrophages. Cependant, sa présence est aussi requise pour réprimer l'expression d'autres gènes dans des monocytes activés par l'IFN- γ (Ramana et al., 2000). De même, le facteur AP1 est connu pour son action activatrice de l'expression des gènes.

Cependant, il est capable, en concert avec d'autres facteurs, de réprimer l'expression d'autres gènes (Shaulian et al., 2001).

L'activation M2 a un faible effet sur l'expression des sulfotransférases, à l'exception de HS2ST1, UST et HS3ST2. Ces observations sont en accord avec d'autres travaux, dont une étude transcriptomique qui a mis en évidence que la polarisation M1 est accompagnée d'une modification d'expression d'environ 90% des 39000 transcrits analysés alors que la polarisation M2 n'entraîne une modification que pour 8% de ces transcrits (Martinez et al., 2006). Ainsi, les macrophages M0 et M2 présentent de fortes similitudes, et seuls quelques centaines de gènes voient leur expression modifiée par les stimuli pro-M2. Bien que peu nombreuses, ces modifications entraînent toutefois un changement de phénotype des macrophages et leur confèrent des fonctions particulières, comme il l'a été mentionné en introduction de ce chapitre. Nous avons d'ailleurs mis en évidence dans notre étude une surexpression des 2-*O*-sulfotransférases agissant sur les HS et les CS dans les macrophages M2, indiquant que la 2-*O*-sulfatation est une caractéristique particulière de ce type d'activation. De même, l'expression de la HS3ST2 est augmentée par la polarisation M2, suggérant une importance de cette enzyme dans la biosynthèse des HS exprimés par les macrophages M2.

L'étude bio-informatique a permis de compléter les résultats sur l'expression des sulfotransférases, en identifiant les potentiels facteurs de transcription impliqués dans la régulation de leur expression dans les macrophages. Sur la base de ces données, des études de régulation transcriptionnelle pourront être initiées au Laboratoire afin de décrypter l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de ces enzymes. Par son caractère dynamique, la polarisation des macrophages est un excellent modèle pour étudier ces phénomènes de régulation.

IV. Discussion

Les macrophages participent à de nombreux processus physiologiques. Ils interviennent dans les réponses immunitaires innées ainsi que dans la mise en place des réponses adaptatives. Ils sont également des acteurs majeurs de l'homéostasie tissulaire, grâce à leur capacité de phagocytose et à la production de facteurs de remodelage des tissus. Finalement, ils participent à d'autres phénomènes plus généraux tels que la régulation de l'homéostasie du fer ou encore la régénération des muscles. Ces nombreuses fonctions sont permises grâce à la plasticité phénotypique de ces cellules, qui est dépendante de leur microenvironnement et du contexte cytokinique. Les modifications phénotypiques sont accompagnés d'une profonde réorganisation transcriptionnelle et épigénétique, qui entraîne une régulation différentielle de nombreux métabolismes cellulaires (Biswas et al., 2012; Martinez et al., 2006).

Les GAGs sont des polysaccharides linéaires sulfatés sur différentes positions par plusieurs familles de sulfotransférases, dont l'expression varie en fonction du type cellulaire et de l'environnement cytokinique. Ainsi, en fonction des sulfotransférases exprimées, les GAGs présentent différents motifs de sulfatation, qui conduisent à la fixation de différents facteurs et donc potentiellement à des fonctions différentes. L'impact de la polarisation des macrophages sur la biosynthèse des GAGs, et donc sur leur structure, n'avait jamais été étudié. Etant donné l'importance de ces polysaccharides dans de nombreux processus physiopathologiques, et notamment lors de phénomènes inflammatoires, nous avons analysé les changements subis par les GAGs lors de la polarisation des macrophages. Le dosage des HS et des CS/DS synthétisés nous a permis de mettre en évidence une augmentation de la quantité totale de GAGs dans les macrophages M2 par rapport aux M1. L'utilisation d'anticorps anti-GAGs, reconnaissant des motifs de sulfatation différents, a suggéré que les deux types d'activation, en plus de modifier la quantité de GAGs, influent aussi sur leur structure et les schémas de sulfatation.

Afin de confirmer ce point, nous avons analysé l'expression de toutes les sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse des HS et des CS, dans les macrophages M0, M1 et M2. Comme nous l'attendions, nous avons détecté de fortes modifications d'expression de plusieurs de ces enzymes. En effet, l'expression des NDST1 et NDST2 est augmentée dans les macrophages M1 par rapport aux macrophages M0 et M2. De même, la stimulation par des stimuli pro-inflammatoires entraîne une forte augmentation de l'expression de la HS3ST3B, alors qu'elle n'est quasiment pas exprimée dans les macrophages M0 et M2. A l'inverse, l'expression des HS3ST1, HS3ST2 et HS2ST1 est plus forte dans les macrophages M2, mais

cette différence est en partie due à un mécanisme de répression dans les macrophages M1, plutôt qu'à une induction par les stimuli pro-M2.

Pour les enzymes agissant sur les CS et DS, des différences d'expression ont aussi été mises en évidence. L'expression de la C4ST1 est augmentée dans les macrophages M1 alors que celle des C4ST3 et UST est plus forte dans les macrophages M2. Cependant, comme pour les sulfotransférases agissant sur les HS, cette différence d'expression est principalement due à un mécanisme répresseur dans les macrophages M1 plutôt qu'à une activation dans les macrophages M2. En effet, le niveau d'expression de C4ST3 est équivalent dans les M0 et les M2, mais est drastiquement réduite dans les M1. Comme pour la HS2ST, l'expression de l'UST est induite par les facteurs pro-M2. Ces données indiquent que les 2-*O*-sulfotransférases agissant sur les HS et les CS sont surexprimées dans les macrophages M2, suggérant que la 2-*O*-sulfation est une caractéristique des macrophages M2. Cela est d'ailleurs confirmé, au moins pour les HS, par la fixation plus importante de l'anticorps AO4B08, qui reconnaît des épitopes 2-*O*-sulfatés dans les HS.

Finalement, nous avons développé un système de co-culture entre des macrophages et la lignée cellulaire MDA-MB-231 de cancer du sein. Ce modèle nous a permis de montrer que les GAGs des macrophages M2 sont capables de présenter le FGF-2 aux cellules cancéreuses et ainsi d'induire leur prolifération. Les GAGs portés par les macrophages M2 pourraient donc participer à leur activité pro-tumorale en concentrant et présentant *via* leurs chaînes GAGs des facteurs de croissance ou autres composés prolifératifs.

Ces expériences sont d'ailleurs en accord avec une étude précédente qui avait montré que les macrophages pouvaient présenter le FGF-2 à des cellules environnantes et ainsi induire leur prolifération, et ce de manière dépendante du syndécan-2 (Clasper et al., 1999). Afin de vérifier si ce protéoglycane peut, dans notre modèle, être impliqué de la présentation du facteur de croissance, nous avons comparé son expression dans les macrophages M1 et dans les macrophages M2. Comme démontré dans la Figure 27, nous avons observé une forte expression du syndécan-2 dans les macrophages M2 par comparaison aux M1. Ces données sont donc en accord avec les travaux de Clasper et al. et suggèrent que les chaînes GAGs portés par le syndécan-2 sont impliquées dans la présentation du FGF-2. Des études complémentaires d'inactivation d'expression sont toutefois nécessaires pour déterminer précisément le rôle de ce protéoglycane.

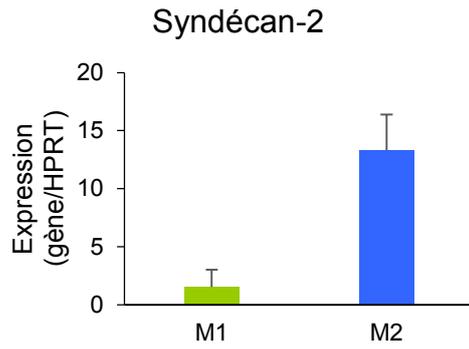


Figure 27 : Expression du syndécan-2 dans les macrophages M1 et M2. L'expression de l'ARNm du syndécan-2 a été analysée par PCR en temps réel après 48 h de différenciation. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes : S : 5'-CTG CTCCAAAAGTGGAAACC-3' et AS : 5'- TGGGTC CATTTCCTTTCTG-3'. L'expression du transcrit de l'HPRT a été utilisée pour normaliser les données. Les valeurs \pm SD ont été obtenues à partir de 4 expériences indépendantes.

Chapitre 3 : Rôle des GAGs dans les métastases de cancers du sein

I. Introduction

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus meurtrier, puisqu'il conduit au décès d'environ 20% des patientes. Bien que plusieurs facteurs de risques aient été mis en évidence (âge, facteurs héréditaires, facteurs hormonaux), l'étiologie de la maladie reste incertaine et la totalité des mécanismes moléculaires impliqués est loin d'être totalement décryptée.

Les glycanes présents sur les cellules cancéreuses participent à la mise en place du phénotype invasif et agressif des tumeurs malignes. Ils interviennent au niveau des interactions cellules-cellules et cellules-matrices ainsi qu'en modulant les activités de nombreux facteurs extracellulaires. Il est connu depuis les années 1970 que les GAGs exprimés par les cellules de cancers du sein subissent de nombreuses modifications lors de la transformation maligne (Takeuchi et al., 1976). A cette époque, les méthodologies avaient permis de montrer des variations quantitatives des GAGs produits par des cellules mammaires malignes par rapport à des cellules non cancéreuses. Par exemple, une étude utilisant les lignées mammaires cancéreuses MDA-MB-231, MCF-7 et la lignée mammaire normale HBL-100 avait montré que les premières produisent une proportion des GAGs supérieure à celle de la lignée HBL-100. Cette étude avait également souligné que la structure des GAGs était altérée dans les lignées cancéreuses puisque leur densité de charges étaient différentes de celles exprimées par les lignées normales (Chandrasekaran et al., 1979). Toutefois, une autre étude avait montré que des cellules primaires issues de carcinomes mammaires synthétisaient une quantité réduite de GAGs par rapport à des cellules issues de tissus sains (Emerman et al., 1988). Ces travaux ont été repris par la suite, et une nouvelle étude comparative des GAGs provenant de tissus mammaires cancéreux avec ceux extraits de tissus sains a mis en évidence une augmentation significative de la quantité de GAGs sulfatés dans les tissus cancéreux. Les auteurs de ce travail ont également montré que la proportion de CS avait tendance à augmenter dans les tissus cancéreux, alors que celle des DS et HS diminuait (Alini et al., 1991). D'autres travaux ont confirmé que la quantité de GAGs et la longueur des chaînes dans les tissus cancéreux sont plus grandes que celles des tissus sains. De plus, la proportion de CS est bien augmentée dans les tissus cancéreux au détriment de celles des HS et des DS (Losa et al., 1993; Vijayagopal et al., 1998). Finalement, une étude récente a établi une corrélation entre la quantité de GAGs dans les tumeurs primaires et la formation de métastases chez les patients (Weyers et al., 2012).

Comme attendu, les modifications structurales des GAGs ont été corrélées à des modifications d'expression des enzymes de biosynthèse. Ainsi, une première étude a montré que les enzymes CHST11, B4GALT3 et CHST6 sont surexprimées dans les tissus cancéreux alors que d'autres, telles que HS3ST4, EXTL1 et UST sont sous-exprimées (Potapenko et al., 2010). D'autres travaux ont reporté qu'en fonction du phénotype métastatique des cellules cancéreuses, les enzymes de biosynthèse des GAGs sont différemment exprimées, ce qui suggère que les modifications structurales de ces molécules participent au caractère invasif (Fernández-Vega et al., 2013). De plus, la surexpression d'enzymes modifiant les GAGs, comme les héparanases et les 6-*O*-endosulfatases, a été décrit dans de nombreux cancers et associée à la survenue de métastases (Hammond et al., 2014).

Les métastases des cancers du sein sont à l'origine de 90% des décès observés dans les pathologies. Il est donc très important d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents afin de pouvoir établir de nouveaux traitements. Comme évoqué précédemment, plusieurs études ont montré que les modifications structurales des GAGs sont associées à la formation des métastases. En complément, il a été souvent reporté que l'héparine et ses dérivés non-anticoagulants ont des effets protecteurs contre les métastases. Il a alors été suggéré que ces effets étaient probablement dus à l'inhibition des interactions entre les GAGs portés par les cellules cancéreuses et les sélectines (Borsig, 2010). En effet, des études réalisées *in vitro* ont montré que les sélectines L et P, en plus d'interagir avec leur ligand canonique (sLeX), sont capables de lier les GAGs. Cette liaison est dépendante de la densité de charge des GAGs, et donc de leur taux de sulfatation. Il a ainsi été montré que l'héparine est un excellent compétiteur pour inhiber *in vitro* la fixation du sLeX sur les sélectines L et P (Cooney et al., 2011; Wang et al., 2002).

Les travaux se sont donc orientés sur l'interaction entre les GAGs portés par les cellules de cancers du sein et les sélectines. Ainsi, il a été montré que les HS portés par les cellules de différentes lignées cancéreuses mammaires peuvent lier les sélectines L et P. De plus, les travaux réalisés dans cette étude ont permis d'établir une corrélation entre les niveaux d'expression de certaines enzymes de biosynthèse des HS, telles que EXT1 et HS3ST1, et l'apparition de métastases distantes chez les patientes (Julien et al., 2011). Contrairement à cette étude, une autre équipe a montré que les CS, mais pas les HS, présents à la surface des cellules cancéreuses mammaires étaient impliqués dans la liaison à la P-sélectine. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'élimination des CS membranaires réduit la fixation des cellules cancéreuses aux plaquettes ainsi que l'apparition de métastases pulmonaires *in vivo* (Cooney et al., 2011). Ces données montrent bien que les GAGs portés par les cellules cancéreuses peuvent

servir de ligands aux sélectines et ainsi favoriser la formation de métastases. Cependant, des contradictions persistent quant à l'implication des CS et/ou des HS dans les interactions, et aux types de sélectine pouvant lier les GAGs.

Dans le but de clarifier ces différents points, nous avons caractérisé les GAGs et leurs enzymes de biosynthèse dans trois lignées cellulaires issues de cancers du sein : MDA-MB-231, BT-20 et ZR-75-1. Ces lignées avaient fait l'objet d'une première étude sur leur capacité à lier les sélectines L, P, et E recombinantes *in vitro* (Julien et al., 2011). Dans notre étude, nous avons montré que les GAGs exprimés par ces trois lignées ont des densités de sulfatation différentes, ce qui est corrélé à une reconnaissance différentielle des trois sélectines. Nous nous sommes également intéressés à l'influence du pH sur ces interactions, et nous avons montré que l'acidification du milieu augmente l'affinité de la liaison entre GAGs et sélectines. Enfin, une étude par modélisation moléculaire a permis d'établir les caractéristiques de l'interaction GAGs/sélectines. Les résultats obtenus soulignent l'importance des groupements 3-*O*-sulfates des HS et 4-*O* et 6-*O*-sulfates des CS dans les interactions avec certaines régions basiques plus ou moins conservées des sélectines.

II. Publication

Clin Exp Metastasis (2013) 30:919-931

DOI 10.1007/s10585-013-9592-7

RESEARCH PAPER

Over-sulfated glycosaminoglycans are alternative selectin ligands: insights into molecular interactions and possible role in breast cancer metastasis

Pierre Martinez, Gérard Vergoten, Florent Colomb, Marie Bobowski, Agata Steenackers, Mathieu Carpentier, Fabrice Allain, Philippe Delannoy and Sylvain Julien

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche 8576 du Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Fédératif de Recherche 147, Université Lille Nord de France – Université des Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Electronic supplementary material The online version of this article ([doi:10.1007/s10585-013-9592-7](https://doi.org/10.1007/s10585-013-9592-7)) contains supplementary material

Abstract : Distant metastasis account for about 90% of cancer associated deaths, and yet the oncology field is cruelly lacking tools to accurately predict and/or prevent metastasis. Distant metastasis occurs when circulating tumor cells interact with the endothelium of distant organs and extravasate from the blood vessel into the surrounding tissue. Selectins are a family of carbohydrate receptors well depicted for their role in tumor cells extravasation. They mediate primary interactions of cancer cells with endothelial cells, as well as secondary interactions with leucocytes and platelets, which are also promoting metastasis. The cancer associated carbohydrate antigen sialyl-Lewis x (sLex) has been repeatedly shown to be involved, as selectin ligand, in these interactions. However, recent studies have highlighted that glycosaminoglycans (GAGs), another class of glycans, may also serve as ligands for selectins. We report herein that cancer-associated GAGs are differentially recognized by selectins according to their density of sulfation and the pH conditions of the binding. We also show that these parameters regulate platelets-cancer cells heterotypic aggregation, supporting the idea that GAGs may have pro-metastatic function. Combining our experimental results with in depth analyses of molecular dockings, we propose a model of GAG/selectin interactions robust enough to recapitulate the differential binding of selectins to GAGs, the competition between GAGs and sLex for selectin binding and the effect of sub-physiological pH on GAGs affinities towards selectins. Altogether, our data suggest GAGs to be good ligands for selectins, potentially promoting distant metastasis in a complementary way to sLex.

Key words : Breast cancer, Metastasis, Selectin, Glycosaminoglycan, Sulfotransferase

Introduction

The 5 years survival of patients with distant metastatic disease is low and once detected, metastatic breast cancer is incurable. Distant metastases arise from circulating cancer cells that extravasate from the blood stream to colonize distant organs [1]. Thus, identifying the molecular mechanisms involved in this process is a crucial challenge for breast cancer treatment.

Selectins are calcium-dependent lectins physiologically involved in immune cells trafficking. They also promote distant metastasis by interacting with circulating cancer cells [2]. This pathological role was long considered to be dependent on the expression of sialyl-Lewis x (sLex) glycan antigen by cancer cells [3]. Indeed, sLex is the canonical ligand for all three selectins (E, L and P) that is involved in the immune cells trafficking [4]. However, using experimental setups mimicking physiological blood flow, sLex has been repeatedly shown to mediate selectin-dependent adhesion of epithelial cancer cells onto endothelial cells, [5–7]. In parallel, L (leukocyte) and P (platelet) selectins, but not E (endothelial) selectin, have also been shown to bind to polysulfated ligands such as glycosaminoglycans (GAGs) (e.g. heparin, heparan sulfate, chondroitin sulfate) [8, 9]. *In vitro*, heparin inhibits sLex binding to L/P-selectins, even at 10-fold lower molarities [8]. Moreover, breast cancer patients treated with heparin or non-anticoagulant heparin-derived products were protected against distant metastasis, presumably due to inhibition of selectin-mediated binding of leucocytes and/or platelets to circulating cancer cells [10]. The binding of GAGs to selectin has been shown to depend on their sulfate content [11]. Similarly, the affinity of dendritic polyglycerol sulfate toward L-selectin was shown to be dependent on the size and the charge density of the anionic ligand, suggesting the ligand to interact with cationic amino-acids of the selectin [12]. In parallel,

binding of sulfatide, a sulfated glycolipid, was demonstrated to involve such a cationic area, close but distinct from the calcium/sLex binding pocket of the carbohydrate recognition domain (CRD) of L-selectin [13]. One may therefore hypothesize that GAGs could interact in a sulfate dependent way with a cationic domain to be determined within the CRD of selectins. Similarly to sLex, GAGs such as heparan sulfate (HS) or chondroitin sulfate (CS) can be aberrantly over-expressed on the cancer cells surface. High expression proteoglycan carrying HS, such as syndecan-I or high level of CS in tumors have both been associated with poor outcome for breast cancer patients [14, 15]. Furthermore, the over-expression of enzymes modifying GAGs extracellularly, such as heparanase or sulfatases (sulf-1 or sulf2) has been extensively documented in cancers, and associated with metastasis [16–18]. This highlights the role of GAGs remodeling enzymes in the metastatic cascade, especially regarding cancer cells shedding from the primary tumors, which is stimulated by growth factors release due to GAGs degradation [16, 17]. However, in this study, we are focusing on GAGs expressed at the cell surface of breast cancer cells because they may act as ligands for endogenous lectins and could possibly be involved in a later step of the cascade that is cancer cell arrest in blood vessels. Indeed, we have recently reported that HS of breast cancer cells are recognized by L- and P-selectins [7]. Glycosyltransferases (e.g. EXT1) and sulfotransferases (e.g. HS3ST1), involved in HS biosynthesis, were found to be over-expressed in estrogen receptor (ER) negative breast tumors, which display higher risk of metastasis than ER positive ones [19, 7]. In fact, EXT1 and HS3ST1 gene expression correlated with distant metastasis in breast cancer patients [7]. In parallel, the Kieber-Emmons group showed CS, but not HS, to bind to P-selectin [20, 9]. In their models, CS removal from cell lines decreased both *in vitro* platelet binding and *in vivo* lung metastasis [20, 9]. Altogether, these data suggest that GAGs expressed by cancer cells may act as selectin ligands and promote metastasis. However, there are discrepancies as to what class of GAG, (HS or CS) is relevant for selectin binding. To clarify this point, and to further extend our understanding of GAGs pro-metastatic function, we have undertaken the characterization of the GAG expressed by three breast cancer cell lines, MDA-MB-231, BT-20 and ZR-75-1, that we previously tested for their ability to bind selectins [7]. We report herein that these cell lines,

differing by the density of sulfation of their GAGs, are differently recognized by selectins or activated human platelets. Molecular modeling of GAGs/selectins interactions, suggested the binding affinities to be driven by the density of sulfation, with 3-O sulfation of HS and 4,6-O-sulfation of CS increasing these affinities. We also show that pH condition affect these bindings through amino acids (AAs) polarity modifications.

Material and methods

Cell culture

Breast cancer cell lines MDA-MB-231, BT-20 and ZR-75-1 were a generous gift from Joy Burchell [7]. Cell lines were authenticated by LGF Standards (Middlesex, UK) in February 2011 using the short tandem repeat profile of 16 loci. These 16 loci contain the 9 used by ATCC and each line exactly matched its profile. Cells were cultured in DMEM medium (Lonza, Levallois, France) containing 10% fetal calf serum and kept in culture for a maximum of 3 months after authentication. For binding assays and GAGs extractions cell monolayers were detached using 5mM EDTA in PBS.

GAGs extraction and quantification

EDTA detached cells were lysed for 4hrs, on ice, in lysis buffer (Tris-HCl 50mM, 100mM NaCl, Triton X-100 1%, pH 7.4). Proteins were quantified using the micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Lysates were treated with Pronase E (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (1mg.mL⁻¹, 50°C, 24hrs) and resulting supernatants added with 2M NaCl (10min shaking), before removing the lipid moiety using a chloroform/methanol (v/v) phase extraction. GAGs were precipitated from aqueous phases using ethanol and were dried prior to benzonase (Merck, Darmstadt, Germany) (600mU.mL⁻¹) and type V neuraminidase from clostridium perfringens (Sigma) (500mU.mL⁻¹) digestions (37°C, 12hrs). Remaining GAG mixtures were precipitated by cold ethanol (9:1) overnight, dried and resuspended in distilled water. GAGs were quantified using the colorimetric carbazole assay [21] and sulfate content using the colorimetric 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB) assay [22]. For both assays, standard curve was performed using a serial dilution of mono-sulfated CS extracted from bovine cartilage (Sigma). Absorbance was read at 550nm for carbazole and 656nm for DMMB assay, on an Epoch plate reader (Biotek, Colmar France). When necessary, CS were digested before GAGs and sulfate

quantification, using 100mU.mL⁻¹ of chondroitinase ABC in Tris 50mM, sodium acetate 60mM, pH8 buffer (24hrs, 37°C). When necessary, CS-digested fractions were subsequently submitted to HS digestion using a cocktail of heparinases I, II and III (100mU.mL⁻¹ each) in Tris 20mM, CaCl₂ 4mM, NaCl 50mM, pH7.5 buffer (24hrs, 37°C).

Soluble selectin binding

Adherent cells (1x10⁶) were treated or not with glycosidases (Heparinase I 0.3U, or Chondroitinase ABC 0.3U, or neuraminidase 0.25U) (Sigma), for 2 hours in 1 mL of serum free medium (37°C), as previously described [23, 24]. Cells were EDTA-detached and washed in binding buffers: PBS containing 1% BSA at pH 7.4 or 5.6, added with either CaCl₂ (2mM) or EDTA (5mM). Selectin ligands were probed with recombinant human E/L/P-selectins (R&D Systems, Lille, France). Cells (25x10⁴) were incubated with selectins (10µg.mL⁻¹) for 1 hour on ice in appropriate buffers, followed with FITC anti-human IgG1 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Samples were analyzed on FACScalibur Flow Cytometer (Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, France).

Platelet binding

Human citrated venous blood samples from healthy donors, were purchased from the local blood transfusion center (Etablissement Français du Sang, Lille, France). Platelet Rich Plasma fractions were collected after centrifugation (200g, 30 min) and kept under constant agitation at 20°C for up to 6 days. Prior to each binding assay, platelets were activated with 250µM of TRAP-6 (Thrombin Receptor Activator for Peptide 6) (Anaspec, Fremont, CA), for 15 min at room temperature. Activated platelets were pelleted in PBS containing 5mM EDTA (2000g, 10min) and suspended in appropriate binding buffers for co-incubation with breast cancer cells at a ratio of 200:1 (15 min at room temperature). Co-incubated cells were spun and washed with appropriate buffers and further incubated 30 min on ice with a PE-conjugated mouse anti-human CD62P (P-selectin) (Becton-Dickinson), prior to flow cytometry analysis.

In silico molecular docking

The structure files corresponding to the selectins were retrieved from the RCSB Protein Data Bank website as following: E-selectin: 1G1T, L-selectin 3CFW and P-selectin: 1G1R. GAG hexamer structures were deduced from crystallographic data of heparin (1HPN in RCSB). Docking experiments were performed with the

GOLD software (The Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK), using a spherical binding site of 15 Å radius centered on the H atom of the hydroxyl group of Y94. Lateral chains of AAs within the binding site as well as the ligands were defined as flexible. In order to energetically rank the complexes, the potential energies of interaction were calculated using the simple expression: E-Interaction = E-Complex – (E-Protein + E-Ligand). Energy values were calculated by using the MMFF94 Molecular Mechanics Force Field [25] which is suitable for energy minimization of such compounds. Molecular representations and H-bonds analyses were performed using the Discovery Studio Visualizer (Accelrys, San Diego, CA).

RNA extraction, cDNA synthesis and qPCR

Total RNA from breast cancer cells was extracted using the Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Total RNA was reverse transcribed using Maxima reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) according to the protocol provided by the manufacturer. Primer pairs specific for sulfotransferases (supplementary Table 1) were previously validated by Deligny et al. [24] and Götte et al. [26]. Quantitative PCR was performed using the Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and the Mx3005p Quantitative System (Stratagene, La Jolla, CA) as previously described [24]. Briefly, 40 cycles were programmed as following: 94°C for 30s, 60°C for 30s, and extension at 72°C for 30s. Results were analyzed using the Mx3005p software. HPRT cDNA was used to normalize the expression of transcripts of interest. Relative quantification was performed using the efficiency-based method described by Pfaffl [27].

Microarray analysis

Sulfotransferases gene expression were extracted from previously published microarray data (van de Vijver dataset [28]) and statistically compared between metastatic (n=101) and non-metastatic (n=194) breast cancers as described in Table 1.

Statistical analyses

Unless otherwise stated, statistical significances were tested using one way ANOVA test with Tukey post-test to compare variables between each others. Tests were performed using Graphpad Prism 5 software.

Results

Characterization of GAG content in three breast cancer cell lines

MDA-MB-231, BT-20 and ZR-75-1 cell lines were chosen to ensure the continuity with our

previous study investigating the role of sLex in E-selectin-mediated metastasis [7]. GAGs were extracted from each cell line and quantified before and after digestions with chondroitinase and heparinase. The content in sulfate was quantified in parallel using the DMMB method [22]. The relative content in GAGs (Figure 1a) and sulfate (Figure 1b) was averaged from three independent extractions. Considering the non-specific background (C+H lane), our results indicate that cell lines contained similar amounts of total GAGs and sulfate. Chondroitinase digestion reduced both carbazole and DMMB measurements, demonstrating the presence of sulfated CS. Heparinase digestion further decreased the signals in both assays demonstrating the presence of sulfated HS in all cell lines. Based on these results, we calculated the relative amount of HS and CS which are reported in Figure 1c. MDA-MB-231 cell line tended to express a lesser relative amount of HS (22.8%) than BT-20 (30.1%) or ZR-75-1 (36.4%). However, calculation of the sulfate density of total GAGs, HS and CS indicated that MDA-MB-231 and BT-20 tended to express over-sulfated GAGs compared to ZR-75-1 (Figure 1d). These overall higher densities are due to significant over-sulfation of HS in MDA-MB-231, and over-sulfation of CS in BT-20.

Selectin binding on breast cancer cell lines

We probed the breast cancer cell lines with recombinant selectins and used flow cytometry to assess the presence of their ligands (Figure 2a). Since selectins were reported to bind sLex and CS in a calcium dependent way [29], we probed the cells in presence of either CaCl₂ or EDTA. Moreover, sub-physiological pH values (6.8 to 5.0) were reported to decrease sLex binding while increasing CS binding [30], thus we also measured the binding at a 'low' pH (5.6). All selectins bound sLex-negative MDA-MB-231 cells at physiological pH (Figure 2), albeit at various intensity (L>P>E). Binding was 50 to 65% lower in presence of EDTA. However, at low pH with EDTA, the binding was found to be similar to what was measured at physiological pH with CaCl₂. BT-20 and ZR-75-1 cell lines followed similar trends. Remarkably, the amplitude of the decrease induced by EDTA and the level of binding of selectins measured at low pH, both mirrored the overall degree of sulfation of the GAGs expressed by the cell lines, with strongest signal observed for MDA-MB-231 and lowest for ZR-75-1.

Platelet binding on breast cancer cells

Because platelets/cancer cells interactions are involved in the metastasis cascade [20, 31, 32], we assessed the binding of P-selectin expressing activated platelets to our set of cell lines, in presence of EDTA and in both physiological or low pH conditions. For all three cell lines platelets bound about 20% of the cells at pH 7.4. Low pH increased the percentage of cancer cells bound by platelets, significantly so for MDA-MB-231 and BT-20 (figure 3a and 3b). Moreover, the intensity of the fluorescence measured also increased, suggesting that more platelets bound to each individual cancer cell (Figure 3.a). These binding experiments were repeated using the sLex-negative MDA-MB-231 cells treated or not with glycosidases in order to selectively digest HS (heparinase), CS (chondroitinase) or sialylated glycans (sialidase). Figure 3c shows that both HS and CS digestion reduced the binding of selectins in both pH conditions while desialylation seemed to have an opposite effect. Repeated measures performed on three independent donors indicate that HS may be predominant for this binding, especially at low pH (Figure 3d). However, due to biological variability and complexity of the system (multiple receptors/ligands potentially involved), these observations failed to reach statistical significance. Strikingly, P-selectin binding to MDA-MB-231 treated with glycosidases reproduced the trend observed for the platelet binding (Figure 3e). All together, these results suggest that HS, but also CS, can serve as ligands for P-selectin mediated platelet binding to MDA-MB-231 cancer cells.

Modeling of selectin binding to HS/CS

To better understand the way GAGs bind to selectins and compete with sLex, we undertook a series of docking experiments, using an approach based on Genetic algorithm. Four GAG structures were proposed as ligand to each selectin: CSA and CSE, two chondroitin sulfate polymers based on mono and di-sulfated disaccharides respectively, as well as heparin (HPN) and over-sulfated heparin (HPN RS3) based on tri and tetra-sulfated disaccharides respectively (Figure 4a). Each structure was modeled as an hexamer formed of three repeated disaccharide units. From our observation of previously published crystallographic structures [33], we chose to center the interaction on the conserved Tyrosine 94 within the CRD of selectins. This location, close to the calcium pocket that binds sLex, is somewhat surrounded by conserved clusters of basic AAs, prone to interact with negatively charged structures as previously proposed [13].

For each selectin, docking calculations were performed either at physiological or sub-physiological pH condition, by taking into account the protonation state of acidic AAs. From the ten fittest dockings obtained for each ligand/selectin combinations, we calculated the average relative energy of interaction characterizing the affinity of each interaction (Figure 4b). The lowest complex energies were obtained with L-selectin, while P- and E-selectin displayed similar affinities, strikingly recalling their respective binding to the breast cancer cell lines (Figure 2b). The models predicted that protonation of the selectins should increase their affinity to the GAGs in a sulfate density dependent manner. Furthermore, in the protonated state, selectins should be more sensitive to increased sulfation of the GAGs (CSE>CSA or HPN RS3>HPN). Overall, these predictions fit well with the selectins and platelet binding we actually measured. They also fit with previous report showing that L- and P-selectins bind better to CSE than to CSA [34], and better to over-sulfated heparin than to regular (tri-sulfated) one [11]. Similarly, di-sulfated HPN lost affinity toward L-selectin, especially when de-sulfated on the glucosamine C6 position (Figure S2), consistently with previous report [11]. Therefore, we believe the shallow surface of the selectins CRD, encompassing the sLex-specific calcium pocket, to be a good candidate for the binding site of GAGs.

Topology of GAG/selectin binding

Surprisingly, three dimensional (3D) representations of the multiple dockings did not allow us to define visually a single and simple binding site fitting all GAGs in all selectins. Instead, the topology of the binding seemed extremely variable across the models generated (Figure S3a to S3g). To understand this variability, we analyzed the interactions by listing every H-bond interactions between sulfate groups and AAs in the 6 fittest models of each docking series. These data were then processed to define the molecular areas the most frequently involved in the interactions.

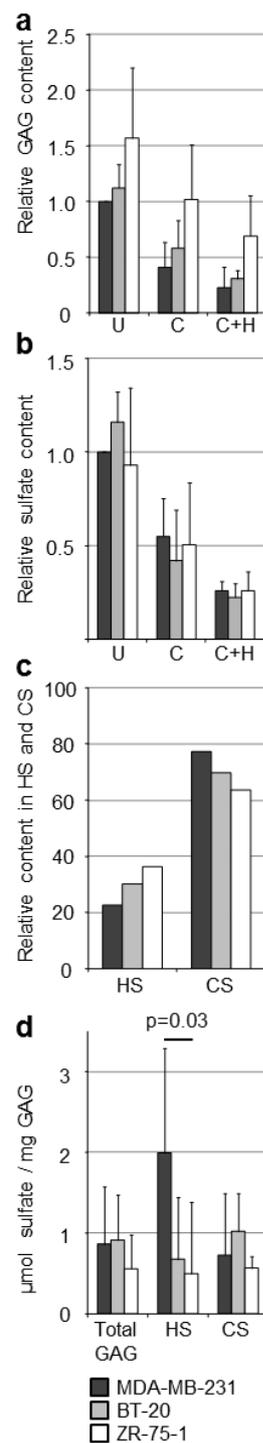


Figure 1 Characterization of GAG content of breast cancer cell lines. **a** GAG content related to untreated MDA-MB-231. **b** Sulfate content related to untreated MDA-MB-231. For A and B, quantification were performed in duplicate and averaged from three independent extractions (Figure S1). U: untreated, **c** chondroitinase, C+H chondroitinase and heparinase. C: Relative content of HS and CS calculated from A. **d** Sulfate density in HS and CS, calculated from C and B. Statistical significance was tested using a paired two ways Student t test.

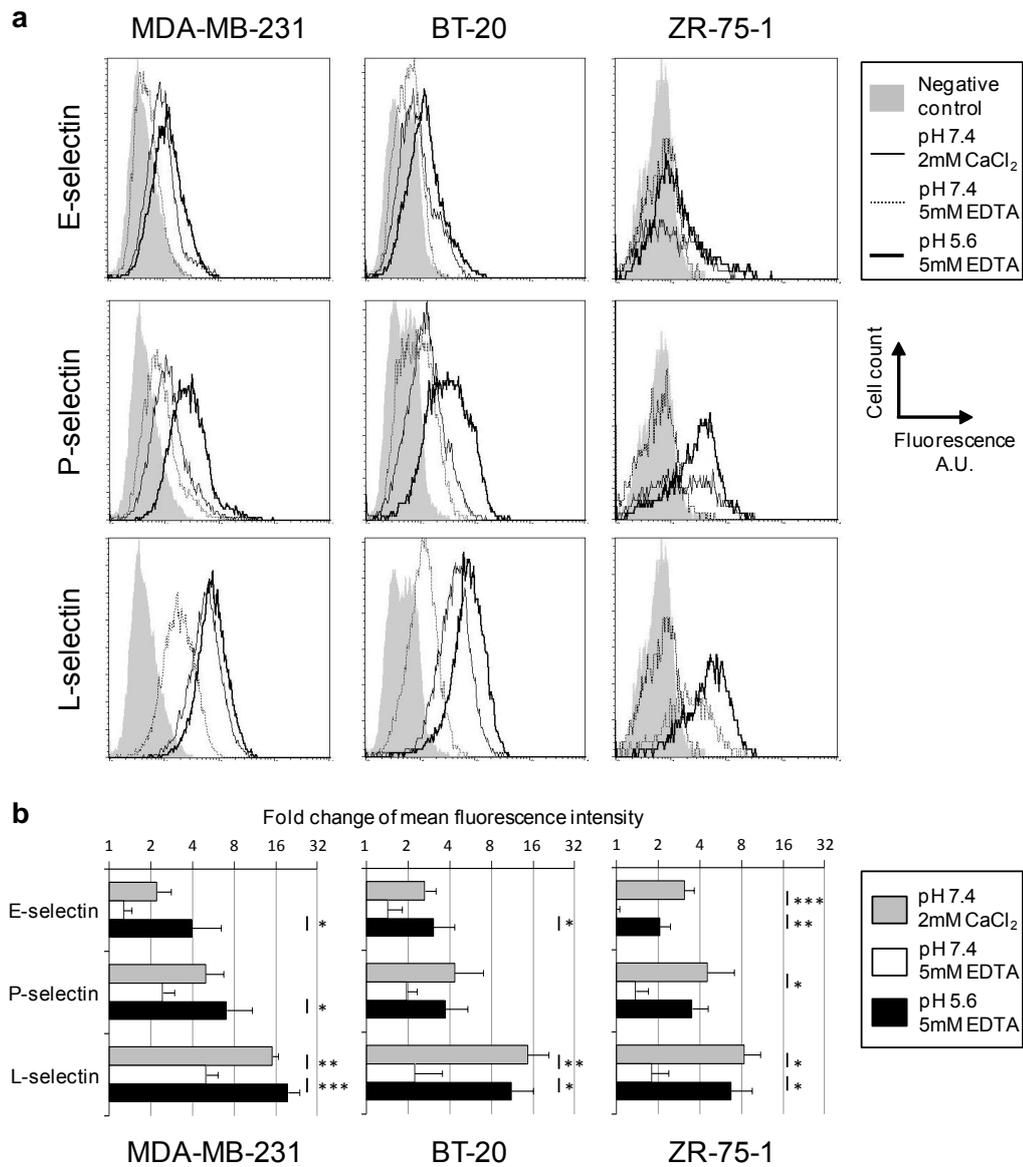


Figure 2 Binding of selectins to breast cancer cells. **a** one representative experiment showing recombinant E-, L- and P-selectins binding to each cell line assessed by flow cytometry. Grey box: signal detected in controls, i.e. in absence of selectins. **b** Selectin bindings were expressed as fold change of mean fluorescence intensity compared to the corresponding control condition. Histograms represent the means of 3 (BT-20, ZR-75-1) or 4 (MDA-MB-231) independent experiments. Statistically significant differences between MDA-MB-231 and other lines are indicated: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

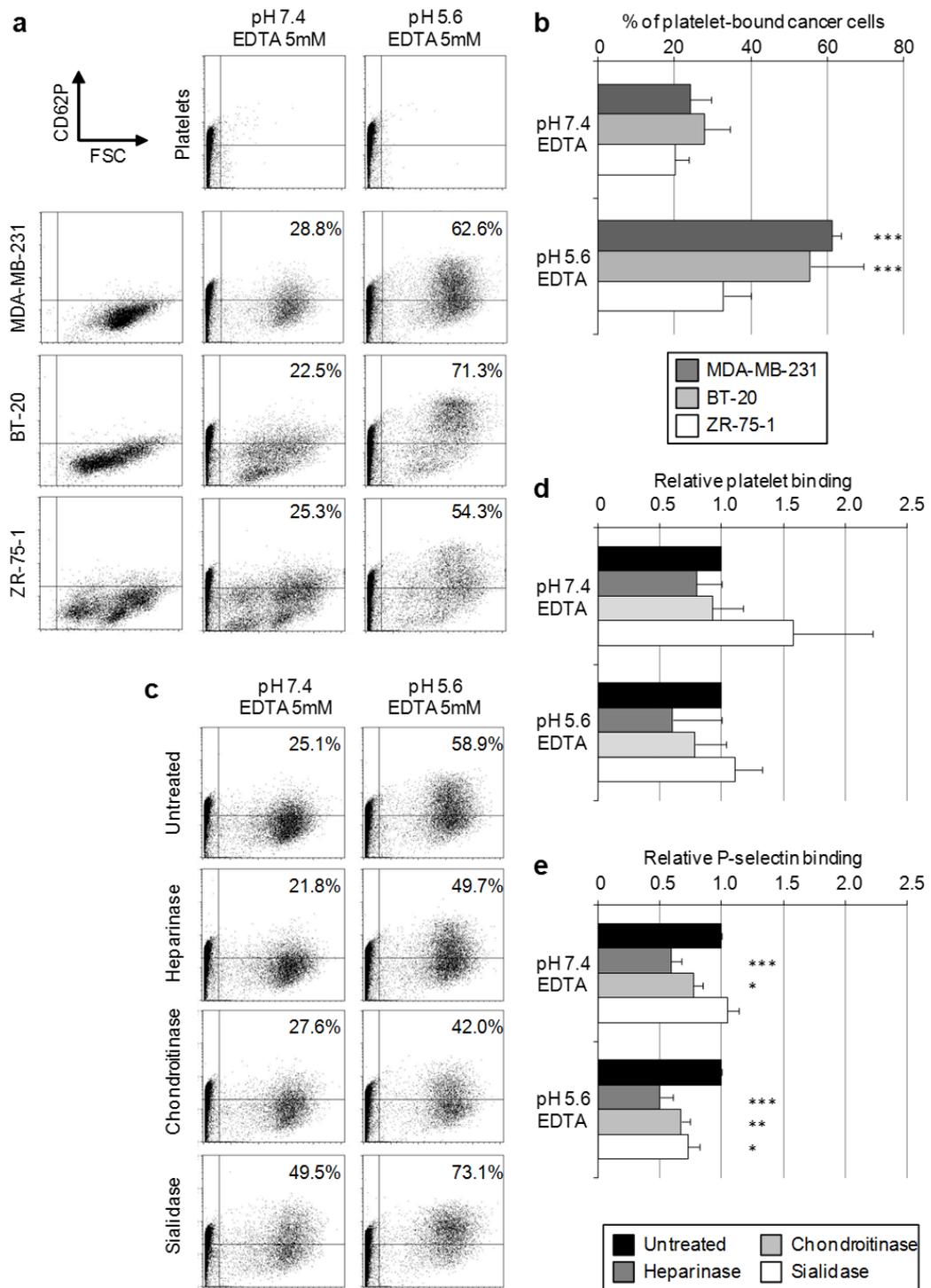


Figure 3 Platelet binding to cancer cell lines. **a** platelet binding to cell lines detected by a fluorescent anti-CD62P (P-selectin) monoclonal antibody (representative experiment). After co-incubation, the percentage of platelet bound cancer cells was calculated using appropriate gated area (excluding platelet). **b** mean of the binding observed for three independent donors, each assessed in duplicate. Significance was tested using a pair matched one way ANOVA test with Tukey post test to compare pH conditions between each others. ***: $p < 0.001$. **c** one representative flow cytometry experiment illustrating the effect of glycosidases on platelet binding to MDA-MB-231. **d** mean of the platelet binding, related to the binding observed for untreated MDA-MB-231, performed with three different donors in duplicate. **e** P-selectin binding, related to the binding observed for untreated MDA-MB-231, performed in triplicate. Statistical significance: n.s. not significant, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

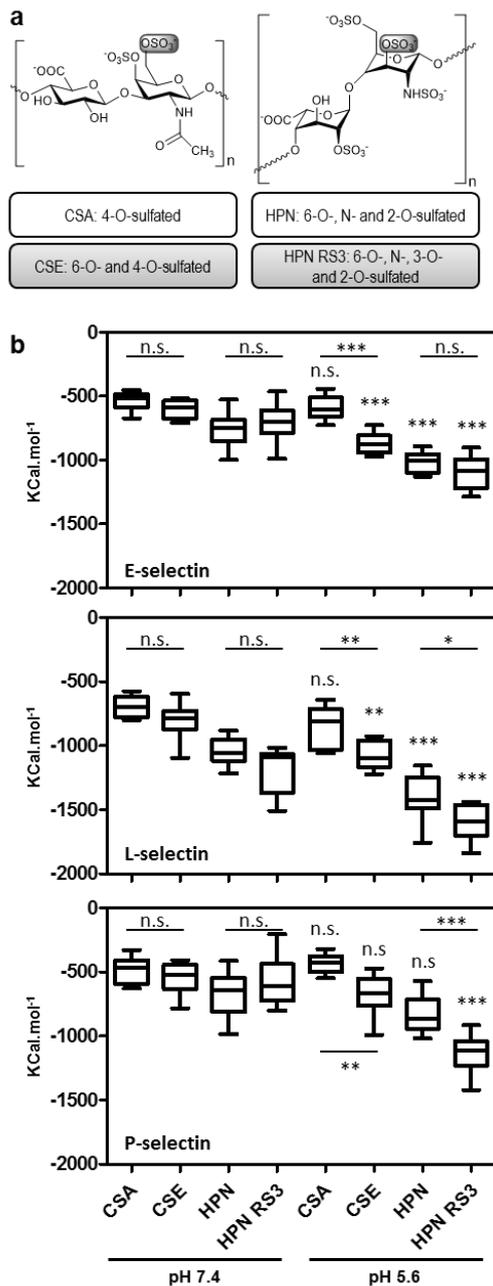


Figure 4 Energy of interaction of GAG hexamers calculated by docking experiments. **a** graphical representation of the GAG modelled for the computation, indicating the position of the sulfate groups on disaccharide units. CS: GlcA β 3GalNAc, HPN: GlcA α 4GalNAc, n=3. **b** energies of interaction calculated for the 10 fittest docking prediction for each GAG/selectin combinations, at physiological state (pH=7.4) or protonated state (pH=5.6). Statistical comparisons between CSA/CSE or HPN/HPN RS3 are on the top of the graph and comparison between pH7.4 and pH 5.6 on the top of the right box corresponding to each GAG. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001.

We identified three clusters of basic AAs, 84-87, 97-100 and 110-113 apparently pivotal for GAG binding (Figure 5a). GAGs bound equally to all three clusters on L-selectin, but due to amino-acid

sequence variations, E-selectin is missing the 84-87 cluster, while P-selectin is missing the 97-100 one. These variations affect the topography of the surface of the CRD with L-selectin displaying a more incurvated surface than the other selectins (Figure 5b). Consequently, in our docking simulations, GAGs fit deeper in the L-selectin CRD, as if embedded in a cleft, compared to E/P-selectins (Figure 5c).

In parallel, we observed that sulfate groups were not uniformly involved in the interactions. We observed that H-bonds connecting GAGs to the CRD were more often provided by the sulfate groups carried by the 4 central residues of the hexamer (Figure S4a). This is fitting with previous report showing that a tetramer would suffice for binding to selectins [35]. High density of sulfates related to high number of H-bonds counted in both physiological and protonated states (Figure S4b), accordingly to calculated affinities. Moreover, highest densities also related to the average number of H-bonds each sulfate group could provide. This last observation could be explained by the fact that, at high sulfate density, clusters of sulfate groups often interacted with the clusters of basic AAs of selectins in a zip-like manner, as illustrated in Figure S5. In that configuration, multiple H-bonds were observed to bridge the ‘teeth’ of both counterparts. Based on the topography of these basic clusters within the CRD, we propose a binding model suitable to recapitulate the topology of the GAG/selectin interactions (Figure 5d). This model describes three possible conformations of binding, observed at various frequencies depending on the selectins (Figure 5e and Figure S3).

Sulfotransferases gene expression profiles in cell lines

In accordance with the binding experiments, our docking experiments suggest that the overall density of sulfation of GAGs is strongly influencing their interactions with selectins. Therefore we investigated the profile of expression of sulfotransferases in the cell lines we used, focusing on the enzymes involved in GAGs over-sulfation (Figure 6). We found that MDA-MB-231 expressed higher levels of sulfotransferases involved in synthesis of CS, CHST11 for CSA (4-O-sulfated), CHST3/CHST7 for CSC (6-O-sulfated CS) and CHST15 for CSE (4,6-O-sulfated CS) compared to ZR-75-1. BT-20 displayed a similar trend. In parallel MDA-MB-231 and BT-20 also overexpressed, HS3ST1 and HST3ST3B compared to ZR-75-1, suggesting

these cell lines being more able to synthesize 3-O-sulfated HS. These results are in accordance with previous reports from us and others [20, 7, 24], and fit well with the density of sulfation of GAGs determined above (Figure 1).

Sulfotransferases association with breast cancer metastasis

To investigate the relevance of CS over-sulfation to breast cancer metastasis, we analyzed the gene expression of CS sulfotransferases using RNA microarray data extracted from a published dataset. As we previously did for HS sulfotransferases analysis [7], we used the van de Vijver dataset which contains data from 295 tumor samples, to compare gene expression between non metastatic (n=194) and metastatic (n=101) breast cancers. We found that sulfotransferases involved in CSA biosynthesis (CHST11 and CHST14) were significantly over-expressed in tumors of patients who developed distant metastasis (Table 1). Moreover, CHST12 (CSA synthesis) and CHST3 (CSC synthesis) were expressed at higher level in metastatic cancers, albeit not reaching statistical significance. No difference was found between the two groups for CHST15 (CSE synthesis) expression. These data support the hypothesis that CS over-sulfation may be involved in distant metastasis in breast cancer.

Discussion

In this study we provide experimental evidence confirming that cancer associated GAGs can serve as ligands for selectins, as previously proposed by us and by others [7, 20]. To detect selectin ligands we used recombinant soluble selectins and assessed their binding to the cancer cells using flow-cytometry. Although similar to the staining we performed previously [7] several improvements in the experimental protocol resulted in slight differences in the observed bindings. For example, in our previous experiments we concluded that L or P selectin binding to MDA-MB-231 was calcium independent because EDTA added to CaCl₂ containing buffer did not interfere with the binding. However, we since observed that 1) whether CaCl₂ (1mM or 2mM) was added to binding buffer or not, the selectin binding was only minimally increased, and 2) in absence of added CaCl₂, EDTA was indeed able to decrease the binding (Figure S5). Together, these results suggest that traces of Calcium might be sufficient to promote selectin binding to GAGs, thus contradicting our previous conclusion.

Interestingly, this very same point was previously discussed by Koenig and collaborators [36]. In parallel, we observed that a 2 hours incubation of suspended cancer cells altered the binding of selectins. For example, L-selectin binding was decreased and E-selectin binding abrogated when MDA-MB-231 cells were incubated in suspension (Figure S6). This effect is possibly due to a remodeling or shedding of the selectin ligands in suspended cells. We thus chose to perform glycosidases digestions on adherent cells rather than on suspended cells. Performing GAG digestions prior to selectins binding, we observed that both HS and CS were recognized by P- (Figure 3e), L- and E-selectin (Figure S6). In our hands, HS seemed to be more accountable for the binding than CS, while Monzavi-Karbassi et al. reported that CS, but not HS, interacted with selectins [9]. This apparent discrepancy can be explained by the fact that they used heparinase III (specific of low sulfated domains) while we used heparinase I (specific of over-sulfated domains) for HS digestion. Notably, the P-selectin binding we observed on MDA-MB-231 cells can actually be linked to the combined contribution of HS, CS and sialic acid content, in order of importance (Figure 3e).

Both experimental (Figure 1 to 3) and docking (Figure 4, S3 and S4) results led us to consider the overall sulfation of GAGs as one key factor mediating their interactions and affinities for each selectin. Carbazole colorimetric assays showed that each tested cell lines displayed a similar amount of GAGs indicating the selectin binding was not related to the overall amount of GAGs. However, cell lines differed regarding the HS/CS ratio and the density of sulfation of HS which was found higher in MDA-MB-231 cells (Figure 1), suggesting a role for sulfate density in selectin bindings. This is further supported, at the molecular level, by the existence of clusters of basic AAs, in the CRD of selectins, which can bind to clusters of sulfate groups via a network of H-bonds (Figure S8). In this context, concomitant 3-O-, N- and 2-O-sulfation of HS disaccharides would appear to be of particular importance by creating such sulfate clusters in GAGs (Figure S4 and S8). One may therefore hypothesize that the nature of the scaffold presenting sulfate to selectins only matters by the number of sulfate group it can actually carry. Supporting this view, numerous GAG and non-GAG polyanionic molecules, such as fucosylated CS [37], fucoidan [38], dextran sulfate [39], inositol polyanions [40] or polyglycerol sulfate [12], have been shown to

bind selectins with sufficient affinities to compete with sLex binding.

One surprising observation we made, was that E-selectin too was able to bind to cancer cells in a GAG-dependent way (Figure 2), whereas GAG binding is usually claimed to be L- and P-selectin specific. Of interest, GAG binding to selectins was primarily investigated using competition assays against polymer bearing clustered sLex [11, 35]. However, E-selectin, compared to L and P-selectins, displays the highest affinity towards sLex tetrasaccharide [41].

Furthermore, our molecular docking studies suggest that GAG binding occurs in an area slightly more distant from the sLex-calcium pocket in E-selectin than in the other selectins. The combination of these two events may explain why E-selectin was less sensitive to competition by GAGs when binding to sLex. In accordance with our observations, dextran sulfate was reported to compete with E-selectin/sLex-mediated binding of neutrophils to endothelial cells [39].

Using our set of breast cell lines, we confirmed that human platelets were able to bind to cancer cells in a GAG-dependent way, as previously shown [20]. This is of importance, because platelets are increasingly investigated for their role in facilitating cancer hematogenous metastasis via selectin-dependent mechanisms [31, 42, 43]. Platelet binding to cancer cells was increased at sub-physiological pH in absence of calcium (Figure 3b), conditions that are favorable to GAG binding but prevent sLex binding [30]. Indeed, at low pH (5.6), the CRD of selectins is further protonated (Figure S9) and therefore able to share more H-bonds with GAGs (Figure S4b). Low pH is not physiological but occurs focally in pathological conditions, such as inflammation [44] or hypoxia [45]. In such conditions, low pH could therefore trigger GAG-mediated recruitment of selectin-expressing cells, i.e. platelets and leucocytes, thus promoting metastatic development [32]. In the context of hematogenous metastasis, cancer-associated GAGs could therefore provide a new way, complementary to sLex-based ligands, for cancer cells to interact with the host cells. The role of L-selectin, the best GAG-binder, in these interactions is currently under study in our laboratory.

The role of cancer-associated GAGs as selectin ligands is further supported by the correlation between sulfotransferases expression and metastasis in breast cancer patients (Table 1) and [7]. To this regard, Cooney et al. recently discussed of the importance of 4-O-sulfation of CS, arguing CSA to promote selectin-mediated metastasis [20]. Our docking results suggest CSE to be a better selectin ligand than CSA. In accordance, CHST15 was significantly more expressed in MDA-MB-231 (Figure 6). However, it was not correlated with metastasis in breast tumors analyzed by microarray (Table1). Alternatively, 4-O-sulfotransferases (CHST11 and CHST14) could be pivotal for the synthesis of CSE by providing higher amounts of CSA to be further sulfated by CHST15 [46]. These results are in line with our previous report showing N- and 3-O-sulfotransferases of HS to be associated with distant metastasis [7]. Accordingly, we found HS3ST1 to be over-expressed in the cell lines binding better to platelets (Figure 5). This is of importance, since 3-O-sulfation is rare and its physiological role poorly understood [46]. This growing body of evidence warrant further and more focused investigations of combinatory expression of GAG sulfotransferases, taking into account the diversity of subtypes of breast cancer and the material to be analyzed in such studies (primary tumors, metastatic lesions or circulating tumor cells)

To summarize, we provide experimental evidence, backed with molecular modeling data, supporting the role of cancer-associated GAGs as selectin ligands potentially involved in the metastatic cascade. In depth analysis of the molecular data prompted us to propose a model of interaction explaining the differential binding of selectins to GAGs, the competition between GAGs and sLex for selectin binding and the effect of sub-physiological pH on GAGs affinities towards selectins. We believe that our data could prove useful for the *in silico* design of potent inhibitors of both class of selectin ligands, such molecules being long awaited in the field of oncology, for anti-metastatic treatments.

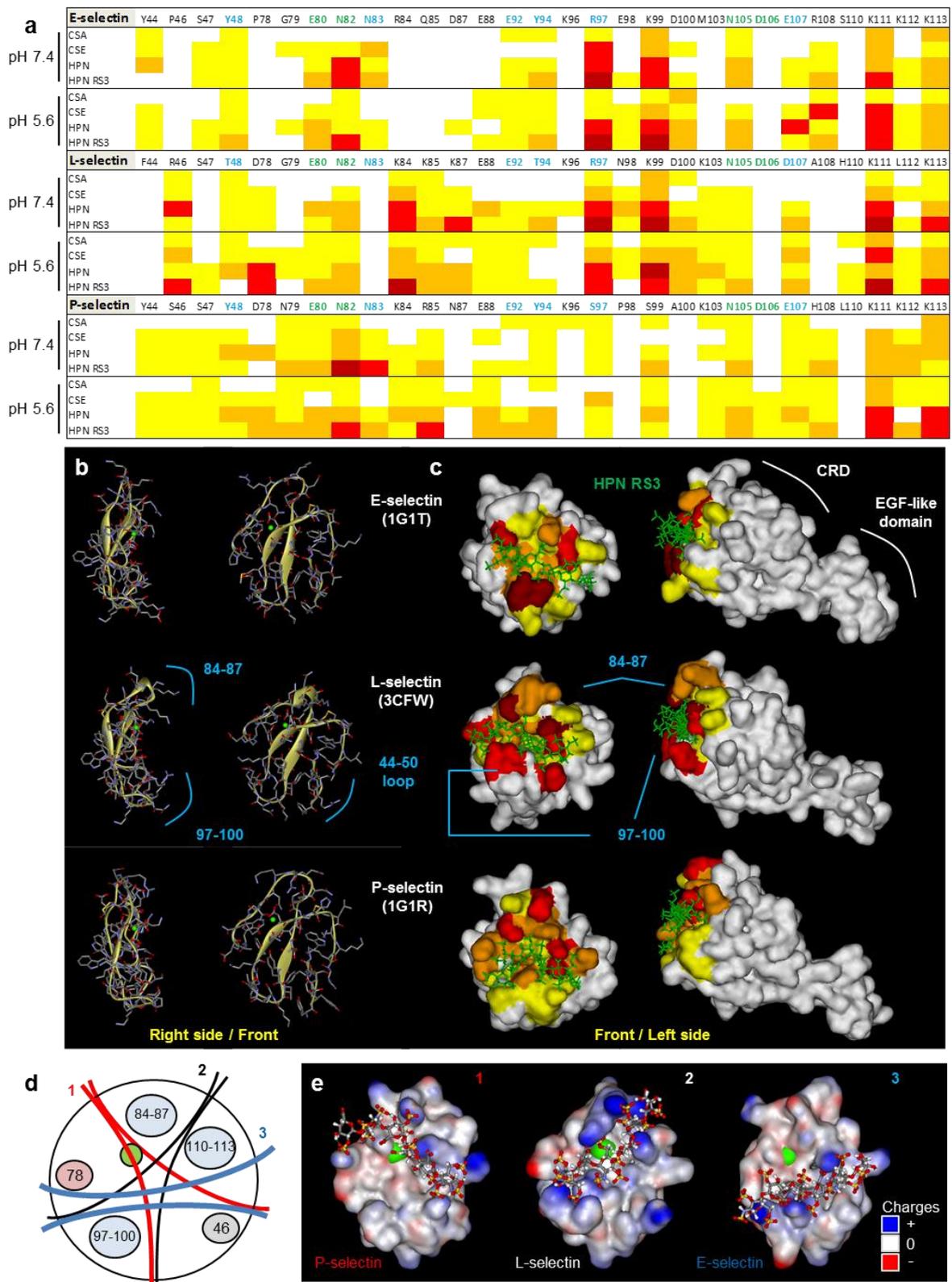


Figure 5 Topography of GAG/selectins interactions. **a** Heat map showing the frequencies at which AAs are involved in H-bonds with sulfate groups. Partial sequence of AAs is indicated for each selectin, with AAs coordinating the calcium ion in green and AAs interacting with sLex in blue. Frequencies are calculated as the mean of sulfate group connecting each AA by at least one H-Bond in the 6 fittest models for each condition, ranging from white (no H-bond) to dark red (>1.5 H-bond). **b** Three dimensional representation of the area designed for GAG docking, comprising a T/F44-W50 loop and a W76-A115 domain (protein in yellow ribbon and calcium in green). **c** Surface

representation of the CRD and EGF-like domain of each selectin. These structures result from docking simulation chosen to display similar orientation of the bound GAG (green), here HPN-RS3 in a protonated state. AAs have been colored according to the frequencies reported in panel A. **d** Diagram summarizing the variety of topologies of the bindings resulting from docking experiments. Clusters of basic AAs are indicated in blue, calcium pocket in green, and position 46 and 78 which are hotpoint for L-selectin docking, in grey and pink respectively. **e** Docking pictures selected from Figure S1 to illustrate the diagram of panel e. Protein surface is colored according to interpolated charge (pH 7.4), GAG (HPN RS3) is in ball and stick, and calcium in green.

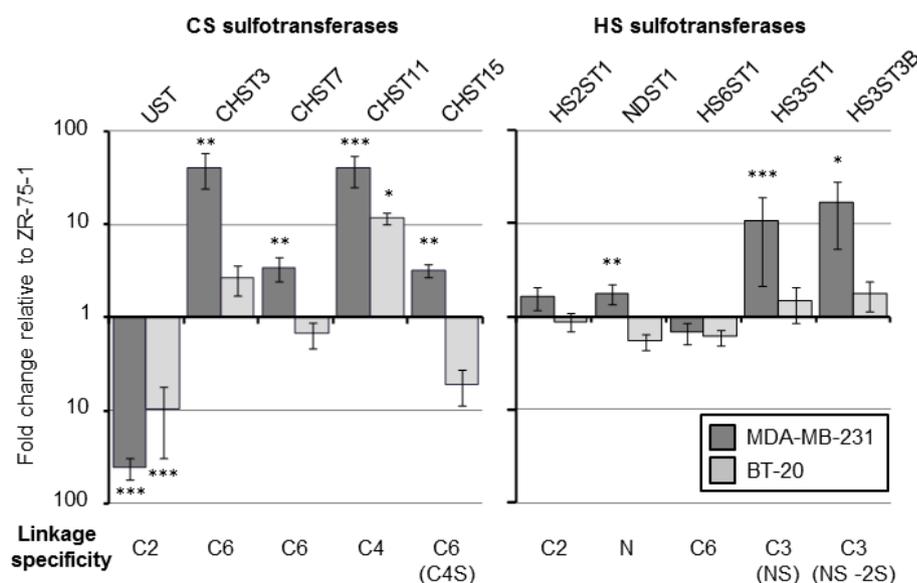


Figure 6 Pattern of expression of sulfotransferases in breast cancer cell lines. Expression of sulfotransferases in MDA-MB-231 and BT-20 cell lines related to ZR-75-1. Linkage specificity of each sulfotransferases is reported at the bottom, indicating the position onto which the sulfate group is transferred (top row) and the requirements in existing sulfation (bottom row). For example: CHST15 requires a sulfate group on C4 to transfer a second sulfate onto C6. Each amplification was performed in triplicate on 4 independent RNA extractions from cell pellets collected at different times. Significance was tested on raw data using the Dunnett's post test on 1way ANOVA analysis to compare MDA-MB-231 and BT-20 to ZR-75-1: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Table 1 Correlation of sulfotransferases gene expression with distant metastasis

| Gene Title | Genbank ID | UGID (Build#204) ^a | p value ^b |
|---------------|------------|-------------------------------|----------------------|
| <i>CHST3</i> | NM_004273 | Hs.158304 | 0,081 |
| <i>CHST11</i> | NM_018413 | Hs.17569 | 0,048 |
| <i>CHST12</i> | NM_018641 | Hs.213088 | 0,166 |
| <i>CHST14</i> | AI871093 | Hs.4042449 | 0,040 |
| <i>CHST15</i> | NM_015892 | Hs.287537 | 0,465 |

a Identification number of the probe used on the microarray chip used by van de Vijver et al. [28].

b Statistical significance was tested with the unpaired two tailed Student's t-test. All p values < 0.05 were considered as statistically significant (bold underlined in grey). Borderline p values are indicated in black and the others in grey

Acknowledgement : Authors would like to thank Pr. Christophe Biot and Pr. Xuefen Le Bourhis for fruitful scientific advising and proofreading. This work was supported by CNRS and Université de Lille1. SJ is

supported by the comité du Doubs de La Ligue contre le Cancer and the GEFLUC (Groupement des Entreprises Françaises pour la LUTte contre le Cancer), PD is supported by le comité de l'Aisne de La Ligue contre le Cancer and the Association pour le Recherche sur le Cancer (Grant n° 7936 and 5023)

References

- Pantel K, Brakenhoff RH (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4(6):448–456
- Läubli H, Borsig L (2010) Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 20(3):169–177
- Cazet A, Julien S, Bobowski M, Burchell J, Delannoy P (2010) Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res* 12(3):204
- Haslam SM, Julien S, Burchell JM, Monk CR, Ceroni A, Garden OA, Dell A (2008) Characterizing the glycome of the mammalian immune system. *Immunol Cell Biol* 86(7):564–573
- Barthel SR, Gavino JD, Wiese GK, Jaynes JM, Siddiqui J, Dimitroff CJ (2008) Analysis of

- glycosyltransferase expression in metastatic prostate cancer cells capable of rolling activity on microvascular endothelial (E)-selectin. *Glycobiology* 18(10):806–817
6. Burdick MM, McCaffery JM, Kim YS, Bochner BS, Konstantopoulos K (2003) Colon carcinoma cell glycolipids, integrins, and other glycoproteins mediate adhesion to HUVECs under flow. *Am J Physiol, Cell Physiol* 284(4):C977–987
 7. Julien S, Ivetic A, Grigoriadis A, et al (2011) Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1139
 8. Varki A (1997) Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest* 99(2):158–162
 9. Monzavi-Karbassi B, Stanley JS, Hennings L, Jousheghany F, Artaud C, Shaaf S, Kieber-Emmons T (2007) Chondroitin sulfate glycosaminoglycans as major P-selectin ligands on metastatic breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 120(6):1179–1191
 10. Borsig L (2010) Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. *Experimental evidence*. *Thromb Res* 125 Suppl 2:S66–71
 11. Wang L, Brown JR, Varki A, Esko JD (2002) Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J Clin Invest* 110(1):127–136
 12. Weinhart M, Gröger D, Enders S, Riese SB, Dernedde J, Kainthan RK, Brooks DE, Haag R (2011) The role of dimension in multivalent binding events: structure-activity relationship of dendritic polyglycerol sulfate binding to L-selectin in correlation with size and surface charge density. *Macromol Biosci* 11(8):1088–1098
 13. Malhotra R, Taylor NR, Bird MI (1996) Anionic phospholipids bind to L-selectin (but not E-selectin) at a site distinct from the carbohydrate-binding site. *Biochem J* 314 (Pt 1):297–303
 14. Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, et al (2003) High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer* 98(3):474–483
 15. Svensson KJ, Christianson HC, Kucharzewska P, Fagerström V, Lundstedt L, Borgquist S, Jirström K, Belting M (2011) Chondroitin sulfate expression predicts poor outcome in breast cancer. *Int J Oncol* 39(6):1421–1428
 16. Barash U, Cohen-Kaplan V, Doweck I, Sanderson RD, Ilan N, Vlodavsky I (2010) Proteoglycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis. *FEBS J* 277(19):3890–3903
 17. Li J-P (2008) Heparin, heparan sulfate and heparanase in cancer: remedy for metastasis? *Anticancer Agents Med Chem* 8(1):64–76
 18. Nadir Y, Brenner B (2009) Heparanase coagulation and cancer progression. *Best Pract Res Clin Haematol* 22(1):85–92
 19. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(19):10869–10874
 20. Cooney CA, Jousheghany F, Yao-Borengasser A, et al (2011) Chondroitin sulfates play a major role in breast cancer metastasis: a role for CSPG4 and CHST11 gene expression in forming surface P-selectin ligands in aggressive breast cancer cells. *Breast Cancer Research: BCR* 13(3):R58
 21. Cesaretti M (2003) A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate Polymers* 54(1):59–61
 22. Barbosa I (2003) Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* 13(9):647–653
 23. Denys A, Allain F, Carpentier M, Spik G (1998) Involvement of two classes of binding sites in the interactions of cyclophilin B with peripheral blood T-lymphocytes. *Biochem J* 336 (Pt 3):689–697
 24. Deligny A, Denys A, Marcant A, Melchior A, Mazurier J, Van Kuppevelt TH, 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(3):1701–1715
 25. Halgren TA (1999) MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *Journal of Computational Chemistry* 20(7):720–729
 26. Gotte M, Spillmann D, Yip GW, Versteeg E, Echtermeyer FG, Van Kuppevelt TH, Kiesel L (2007) Changes in heparan sulfate are associated with delayed wound repair, altered cell migration, adhesion and contractility in the galactosyltransferase I (ss4GalT-7) deficient form of Ehlers-Danlos syndrome. *Human Molecular Genetics* 17(7):996–1009
 27. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45
 28. Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, et al (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347(25):1999–2009
 29. Kawashima H, Hirose M, Hirose J, Nagakubo D, Plaas AH, Miyasaka M (2000) Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. *J Biol Chem* 275(45):35448–35456
 30. Hirose M, Matsumura R, Sato K, Murai T, Kawashima H (2011) Binding of L-selectin to its vascular and extravascular ligands is differentially regulated by pH. *Biochem Biophys Res Commun* 414(2):437–442
 31. Coupland LA, Chong BH, Parish CR (2012) Platelets and p-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells. *Cancer Res* 72(18):4662–4671

32. Labelle M, Hynes RO (2012) The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host-Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discov.* doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0329
33. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT (2000) Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 103(3):467–479
34. Kawashima H, Atarashi K, Hirose M, Hirose J, Yamada S, Sugahara K, Miyasaka M (2002) Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcAbeta1/IdoAalpha1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. *J Biol Chem* 277(15):12921–12930
35. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP (1993) Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 82(11):3253–3258
36. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A (1998) Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest* 101(4):877–889
37. Borsig L, Wang L, Cavalcante MCM, Cardilo-Reis L, Ferreira PL, Mourao PAS, Esko JD, Pavao MSG (2007) Selectin Blocking Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan from Sea Cucumber: EFFECT ON TUMOR METASTASIS AND NEUTROPHIL RECRUITMENT. *Journal of Biological Chemistry* 282(20):14984–14991
38. Bachelet L, Bertholon I, Lavigne D, Vassy R, Jandrot-Perrus M, Chaubet F, Letourneur D (2009) Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1790(2):141–146
39. Matsumiya A, Yamaguchi M, Nakano H, Takeda M, Kumada K (1999) Dextran sulfate inhibits E-selectin-mediated neutrophil adhesion to endotoxin-activated vascular endothelial cells. *Life Sci* 64(2):PL9–17
40. Cecconi O, Nelson RM, Roberts WG, Hanasaki K, Mannori G, Schultz C, Ulich TR, Aruffo A, Bevilacqua MP (1994) Inositol polyanions. Noncarbohydrate inhibitors of L- and P-selectin that block inflammation. *J Biol Chem* 269(21):15060–15066
41. Poppe L, Brown GS, Philo JS, Nikrad PV, Shah BH (1997) Conformation of sLex Tetrasaccharide, Free in Solution and Bound to E-, P-, and L-Selectin. *Journal of the American Chemical Society* 119:1727–1736
42. Gong L, Cai Y, Zhou X, Yang H (2012) Activated platelets interact with lung cancer cells through P-selectin glycoprotein ligand-1. *Pathol Oncol Res* 18(4):989–996
43. Matsui Y, Amano H, Ito Y, et al (2012) Thromboxane A₂ receptor signaling facilitates tumor colonization through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells. *Cancer Sci* 103(4):700–707
44. Lardner A (2001) The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol* 69(4):522–530
45. Nemoto EM, Frinak S (1981) Brain tissue pH after global brain ischemia and barbiturate loading in rats. *Stroke* 12(1):77–82
46. Habuchi O (2000) Diversity and functions of glycosaminoglycan sulfotransferases. *Biochim Biophys Acta* 1474(2):115–127

Supplementary table 1: primers used in qPCR experiments

| Gene title | | Primer sequence | Primer molarity in qPCR mix | Annealing temperature | Efficiency |
|-----------------------------|---------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|------------|
| <i>UST</i> ^a | Forward | 5'-GCAAAGCTGAACGTGAATGA-3' | 600 nM | 60°C | 1,956 |
| | Reverse | 5'-TTCCAAGCTTCCTGTGCTCT-3' | 600 nM | | |
| <i>CHST11</i> ^a | Forward | 5'-ATCAACCACCGCTTAAAAAG-3' | 600 nM | 60°C | 1,993 |
| | Reverse | 5'-TTGATGATCTTGGTGCCGTA-3' | 600 nM | | |
| <i>CHST3</i> ^a | Forward | 5'-ACGCCCTTTTCTTGGTTTTT-3' | 600 nM | 60°C | 2,044 |
| | Reverse | 5'-AGAGCTTGGGGAATCTGCTT-3' | 600 nM | | |
| <i>CHST7</i> ^a | Forward | 5'-GGGGCAATCTGTCACTCT-3' | 600 nM | 60°C | 2,028 |
| | Reverse | 5'-AGGATGCCTTGTGAAATGG-3' | 600 nM | | |
| <i>CHST15</i> ^a | Forward | 5'-TGAGTTCAGCACCAGACAGC-3' | 600 nM | 60°C | 2,050 |
| | Reverse | 5'-CGTACCAACAGGGGCTCTTA-3' | 600 nM | | |
| <i>NDST1</i> ^b | Forward | 5'-ACCACAGCCAGACTGAACGTTTGTG-3' | 600 nM | 60°C | 1,946 |
| | Reverse | 5'-ACAGGGAAATGTCCAGTCTGTCTCC-3' | 600 nM | | |
| <i>HS2ST</i> ^a | Forward | 5'-CGAAGTCCGAGAAATTGAGC-3' | 300 nM | 60°C | 2,050 |
| | Reverse | 5'-AATGAAGTGCTTGCCGTTTT-3' | 300 nM | | |
| <i>HS3ST1</i> ^b | Forward | 5'-TTATCTCCTCGGCGATTCCTTG-3' | 900 nM | 67°C | 1,969 |
| | Reverse | 5'-TAGCCAGTCACTAACTGCTTCTCCAT-3' | 600 nM | | |
| <i>HS3ST3B</i> ^a | Forward | 5'-CTGGCTTCAGGCAAGGAGAT-3' | 600 nM | 60°C | 1,960 |
| | Reverse | 5'-GACCCACTGAAAAAGCTGGA-3' | 600 nM | | |
| <i>HS6ST1</i> ^a | Forward | 5'-GGCCCTTCATGCAGTACAAT-3' | 600 nM | 60°C | 1,980 |
| | Reverse | 5'-TACAGCTGCATGTCCAGTTC-3' | 600 nM | | |
| <i>HPRT</i> ^c | Forward | 5'-GCCAGACTTTGTTGGATTTG-3' | 600 nM | 60°C | 1,980 |
| | Reverse | 5'-CTCTCATCTTAGGCTTTGTATTTTG-3' | 600 nM | | |

^a first published in Gotte et al. (2)

^b first published in Deligny et al.(1)

^c routinely used in our laboratory (3)

1. Gotte M, Spillmann D, Yip GW, et al. Changes in heparan sulfate are associated with delayed wound repair, altered cell migration, adhesion and contractility in the galactosyltransferase I (ss4GalT-7) deficient form of Ehlers-Danlos syndrome. *Human Molecular Genetics*. 2007;17(7):996–1009.[cited2012Dec5]
2. Deligny A, Denys A, Marcant A, et al. Synthesis of heparan sulfate with cyclophilin B-binding properties is determined by cell type-specific expression of sulfotransferases. *J. Biol. Chem*. 2010;285(3):1701–1715.
3. Colomb F, Krzewinski-Recchi M-A, El Machhour F, et al. TNF regulates sialyl-Lewisx and 6-sulfo-sialyl-Lewisx expression in human lung through up-regulation of ST3GAL4 transcript isoform BX. *Biochimie*. 2012;94(9):2045–2053.

Legends to supplementary figures:

Figure S1: GAG and sulfate quantification. A: Example of standard curve obtained with either the carbazole assay to quantify GAGs (based on uronic acid content) or the DMMB assay, to quantify sulfates (based on anionic interactions). B: Three independent extractions from sets of cell pellets (MDA-MB-231, BT-20 and ZR-75-1), collected at the same time, were assessed in duplicate with both quantification assays and averaged to determine the raw content in GAGs and sulfates. Important variations occurred between independent extractions, possibly due to the length of storage of frozen pellets and/or yield of extraction between the sets of cell pellets. These raw data are presented in a set standardized way in figure 1, to better reflect the inter-cell-lines variability observed for each experiment.

Figure S2: Binding energies of various sulfated form of heparin-based HS. Heparin (HPN) de-sulfated on position 6 (HPN DS6) or position 2 (HPN DS2), or position N (HPN DSN), or over-sulfated in position 3 (HPN RS3). Opposite to over-sulfation, de-sulfation decreased the binding energies, whatever the carbon position from which the sulfate group was removed. Amongst the de-sulfated structures, HPN DS6 was however the one displaying the least binding energies. This fact might be explained by a higher availability of the sulfate group present on C6, due to flexibility of the C5 position of the GalNAc. Docking accommodated somewhat more easily this sulfate with the selectin CRD, whatever the binding conformation considered (see figure S3).

Figure S3: molecular docking results. S3A to S3B Six fittest dockings for each GAG structure tested presented by decreasing binding energies from top to bottom. Selectins are colored according to interpolated charges and GAGs drawn as ball and stick. Calcium is green. Each representation is assorted with a number (from 1 to 3) depicting the conformation of the binding according to the model presented in figures 4 and S3G. S3G: diagrams showing the frequencies of conformations of the binding of each GAG structure to each selectins.

Figure S4: Involvement of sulfate groups in modeled GAG-selectin interactions. A: Average number of amino-acids connected by each individual sulfate group of HPN RS3 on each selectin at protonated state. Optimal interactions can be observed for the central tetrasaccharide of the hexamer. Furthermore, similar variations are observed for 3-O- and N-sulfate groups. B Top: Mean of the total number of H-bonds shared between GAG structures and selectins, calculated from the 6 fittest docking (figure S3). B Bottom: average number of H-bonds shared by each sulfate groups.

Figures S5 to S7: selectins binding to MDA-MB-231, assessment of protocol variations. Binding protocol is described in the material and method section, apart for the parameters that are indicated on the figures.

Figure S8: Close up representation of clustered sulfate interaction with the H110-K113 amino-acid domain on L-selectin. H100-K113 has been chosen as an example because it is the only AA cluster to

be conservatively involved in all three selectins. Connections between sulfate groups and AA are color-coded on the Haworth representation, bottom part of the picture, where other relevant H-bond has been indicated too (R46). This picture illustrates some of the many ways clustered sulfate can network with basic AAs, thus suggesting the malleability of these interactions.

Figure S9: Effect of pH variation on AA protonation. Surface representation of selectins, computed using the PROPKA free software, showing the variation of protonation at low pH. Notably, the calcium binding area (indicated by Glu80) lost almost all negative charges, while other part of the proteins remained negatively charged. This may explain why sLe^x no longer binds selectins at low pH as reported by Hirose *et al.*

Figure S1

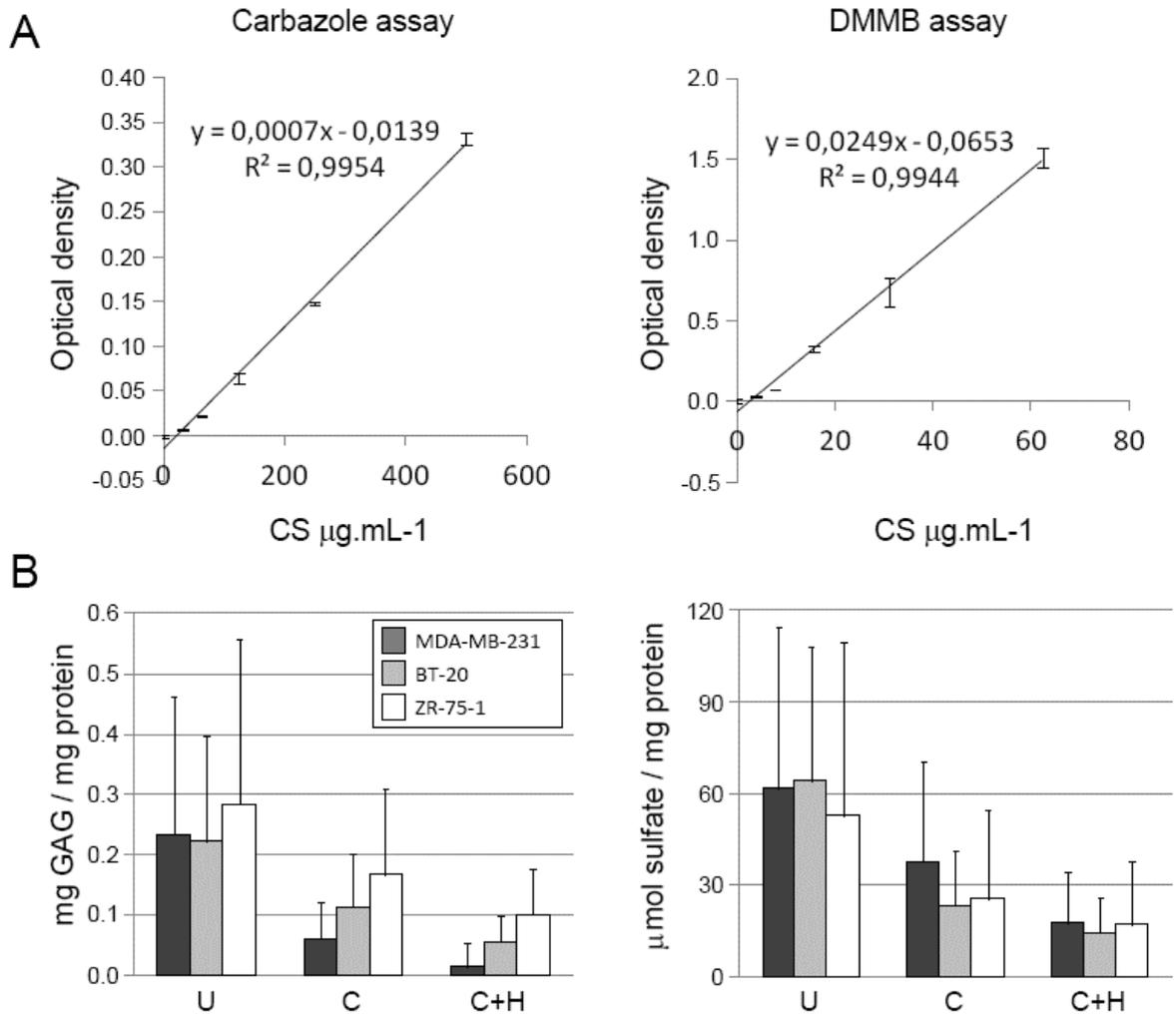


Figure S2

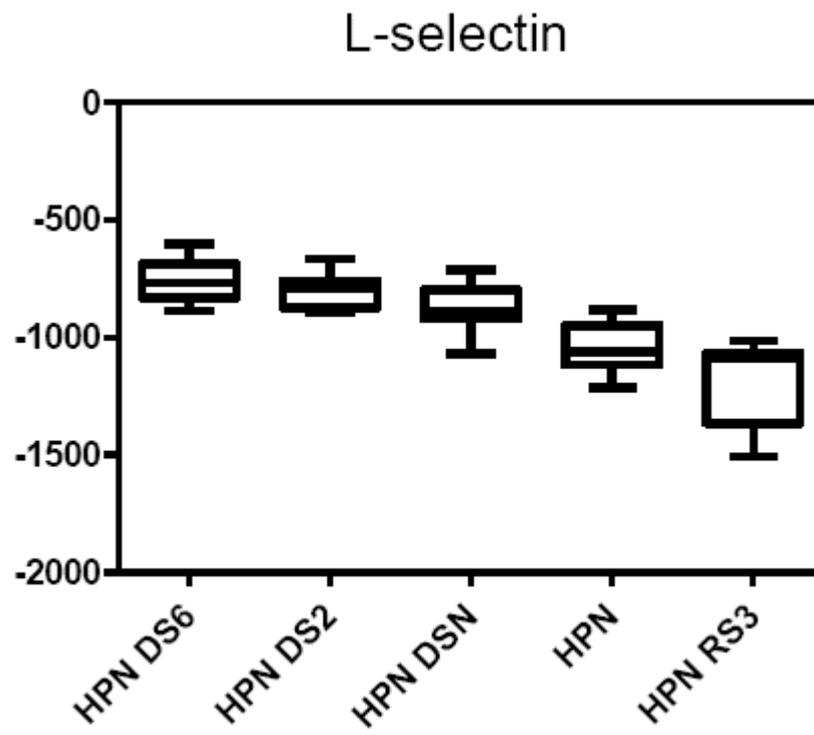


Figure S3A

E-selectin pH 7.4

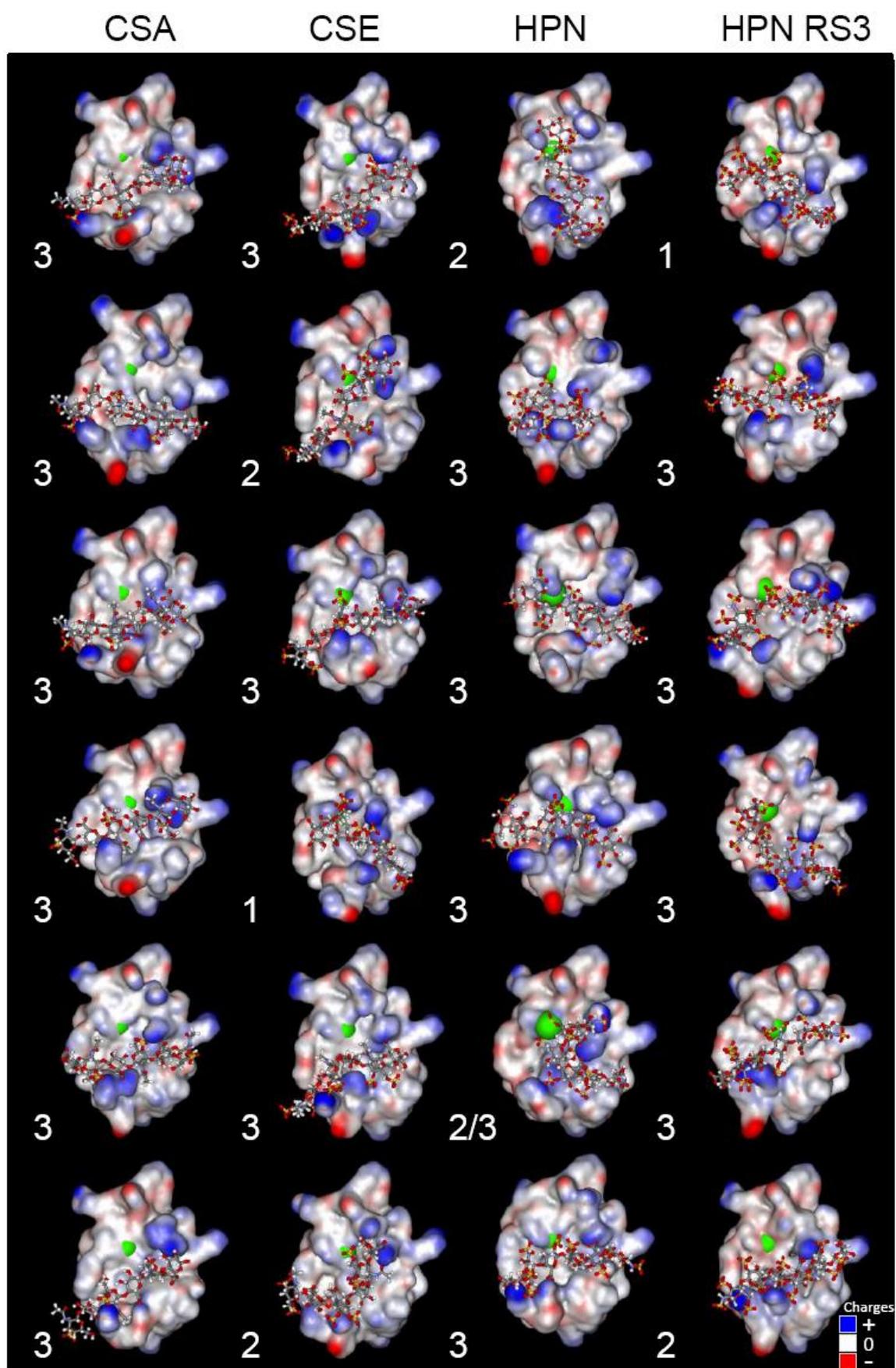


Figure S3B

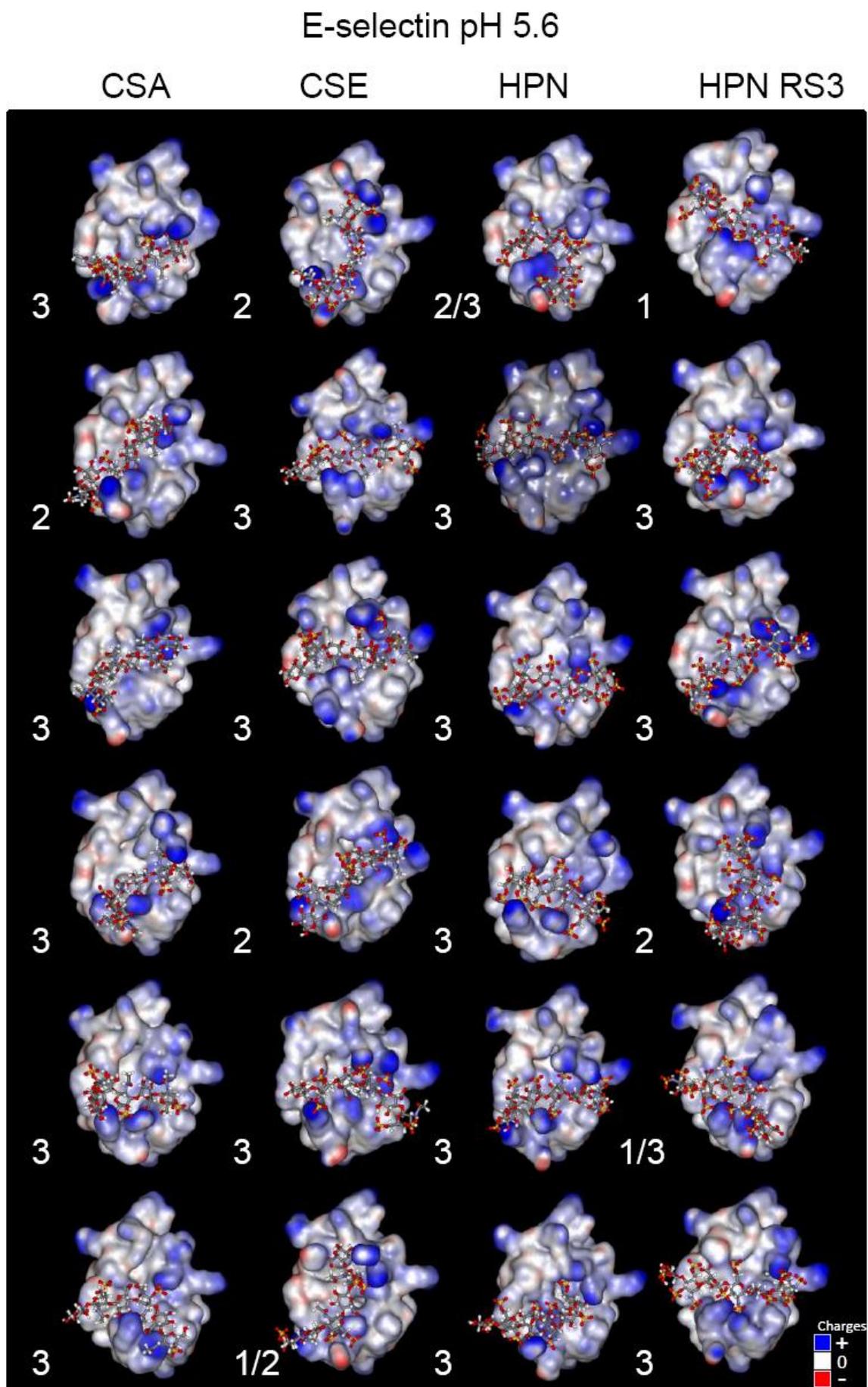


Figure S3C

L-selectin pH 7.4

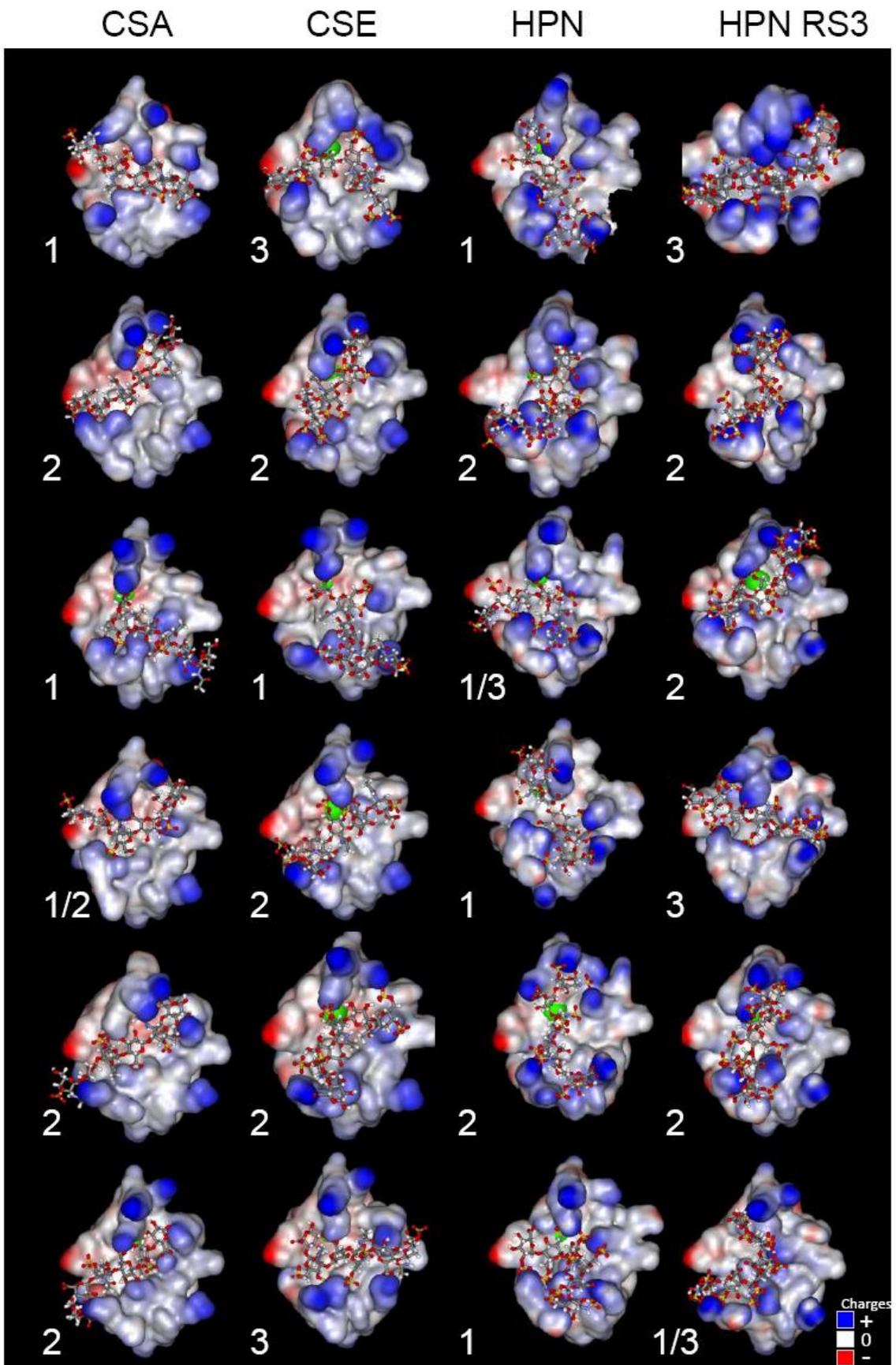


Figure S3D

L-selectin pH 5.6

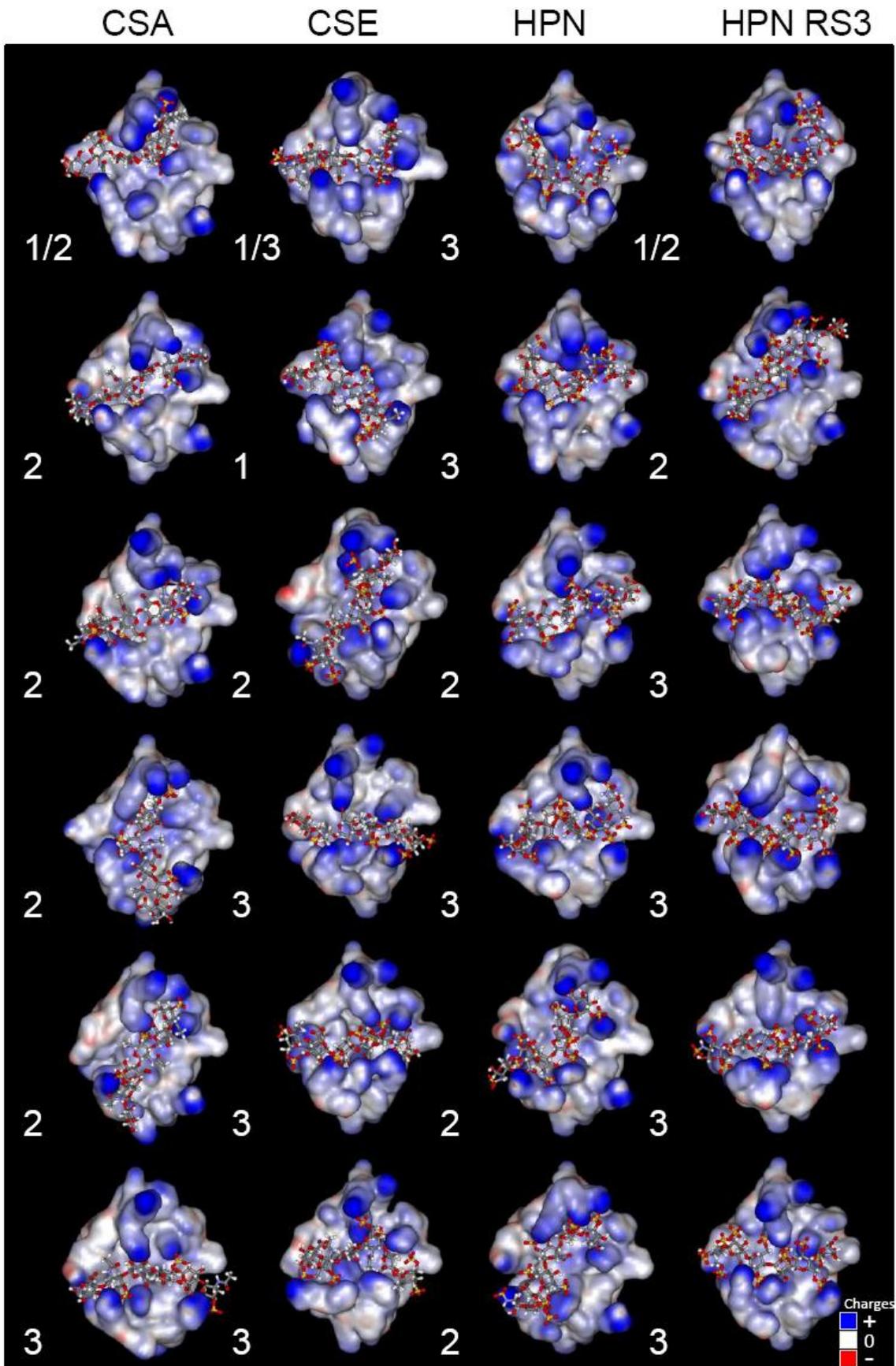


Figure S3E

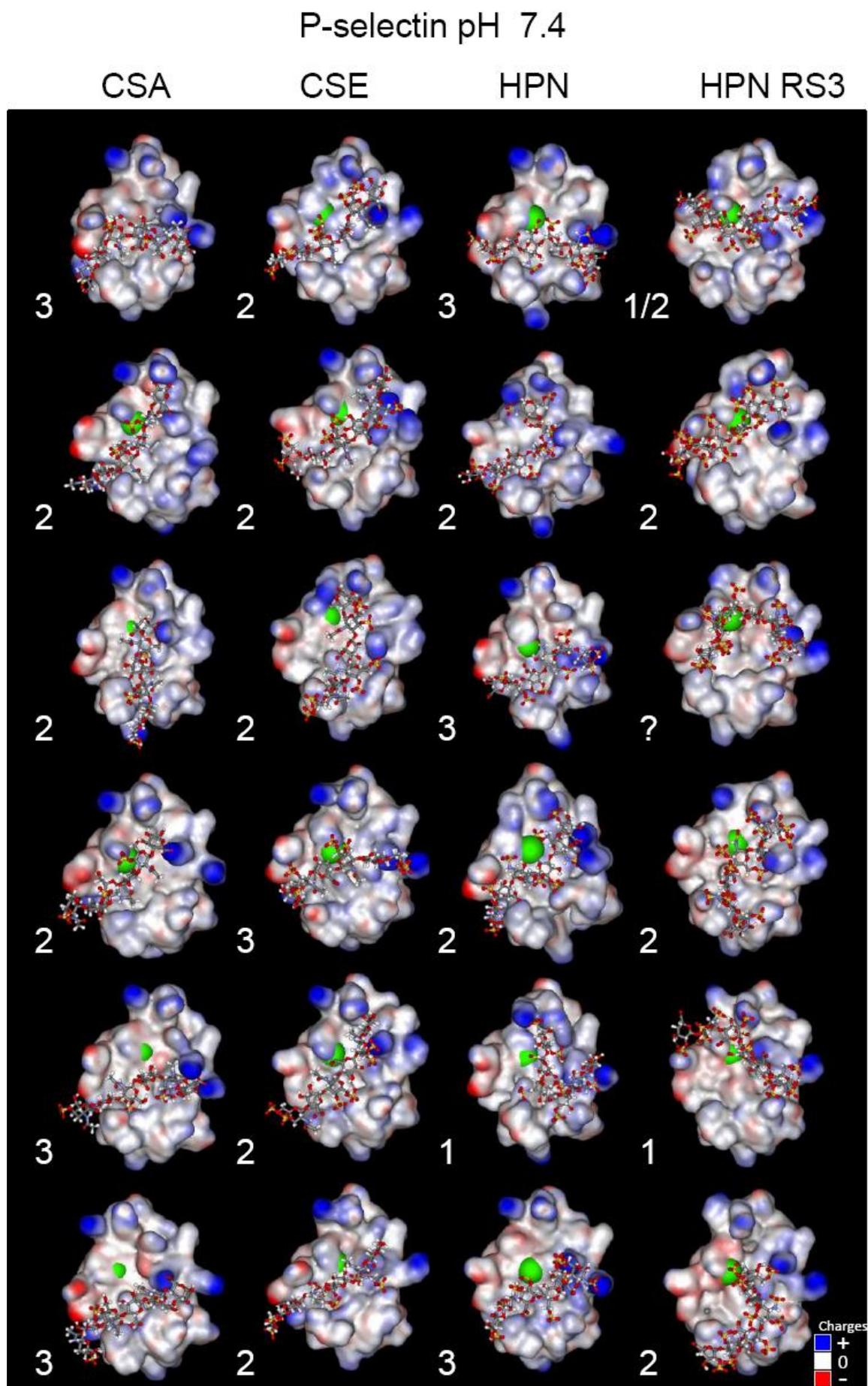


Figure S3F

P-selectin pH 5.6

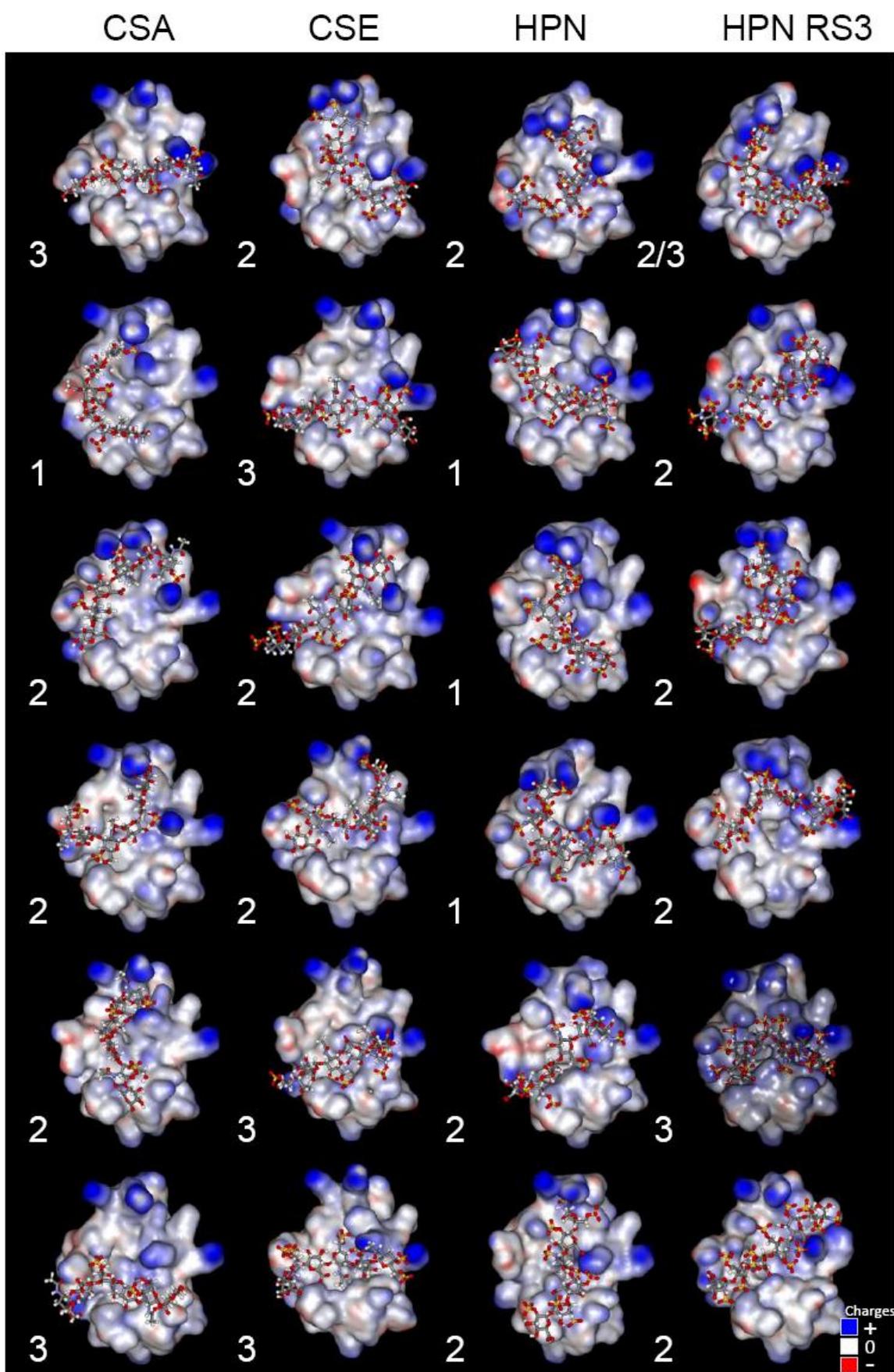
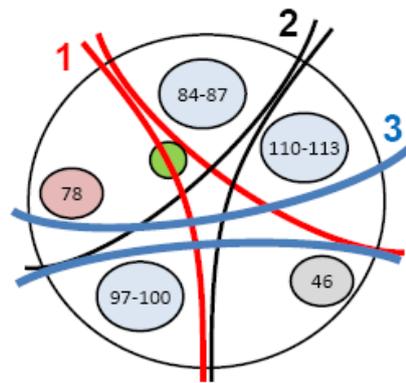
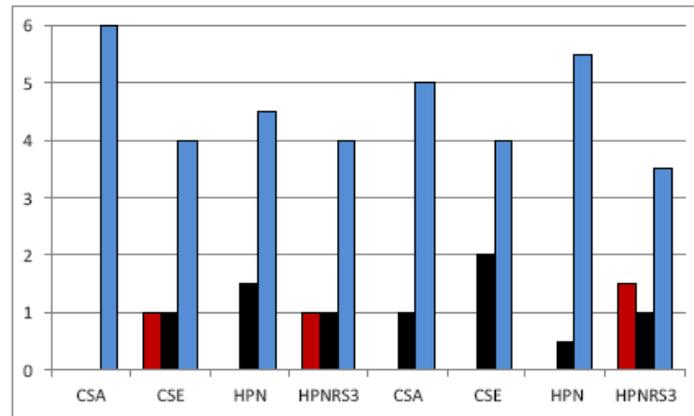


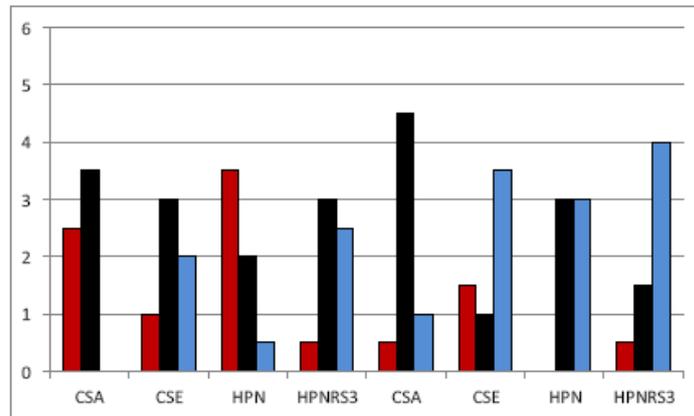
Figure S3G



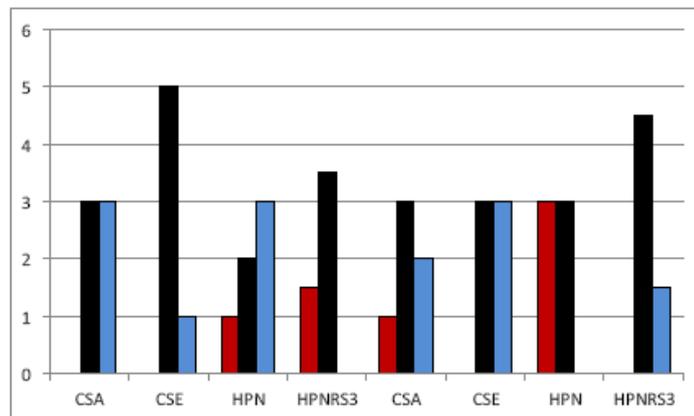
E-selectin



L-selectin



P-selectin



pH 7.4

pH 5.6

Figure S5

Selectin binding on MDA-MB-231 Effect of EDTA/Calcium

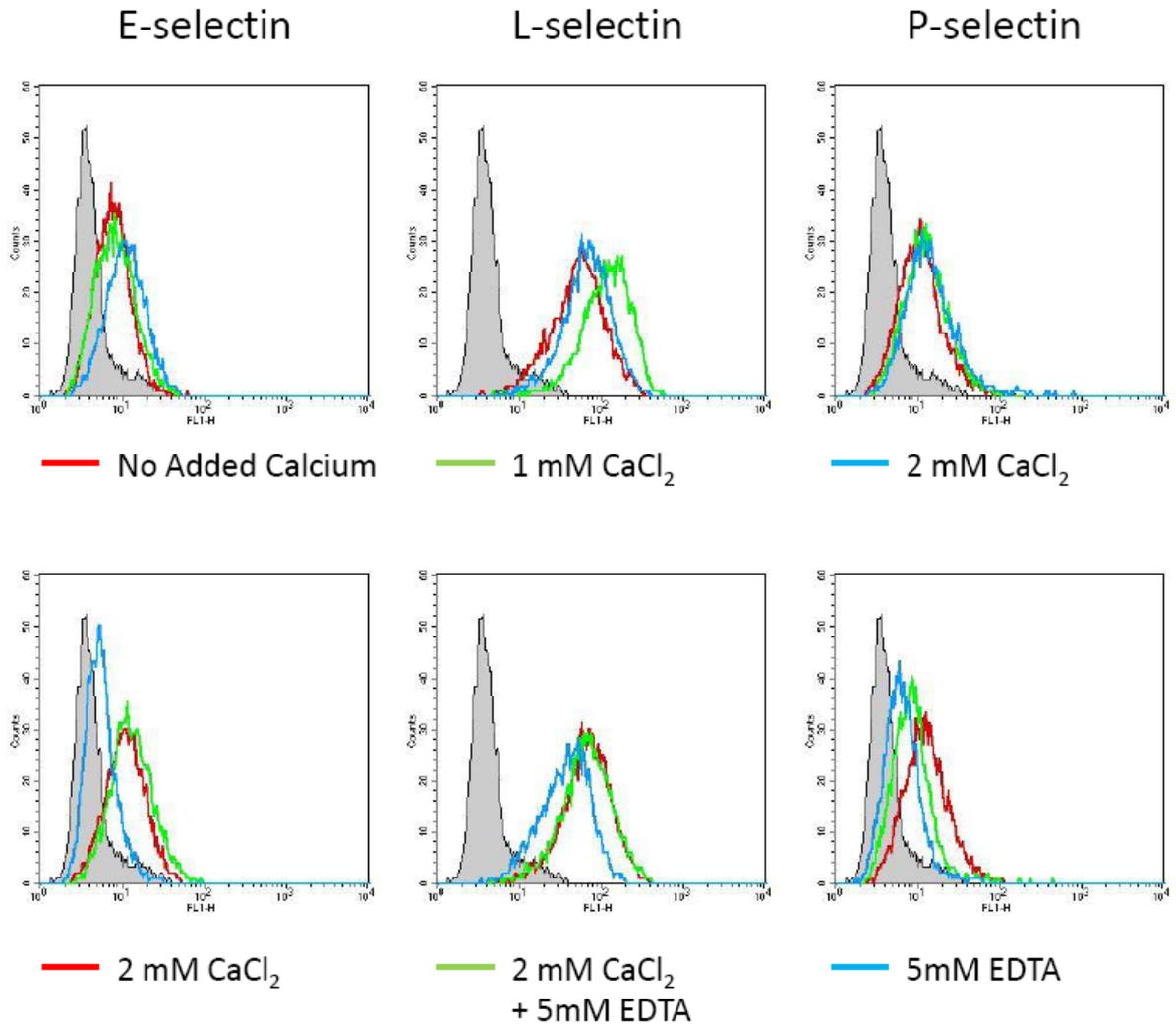


Figure S6

Selectin binding on MDA-MB-231 Effect of Incubation in suspension

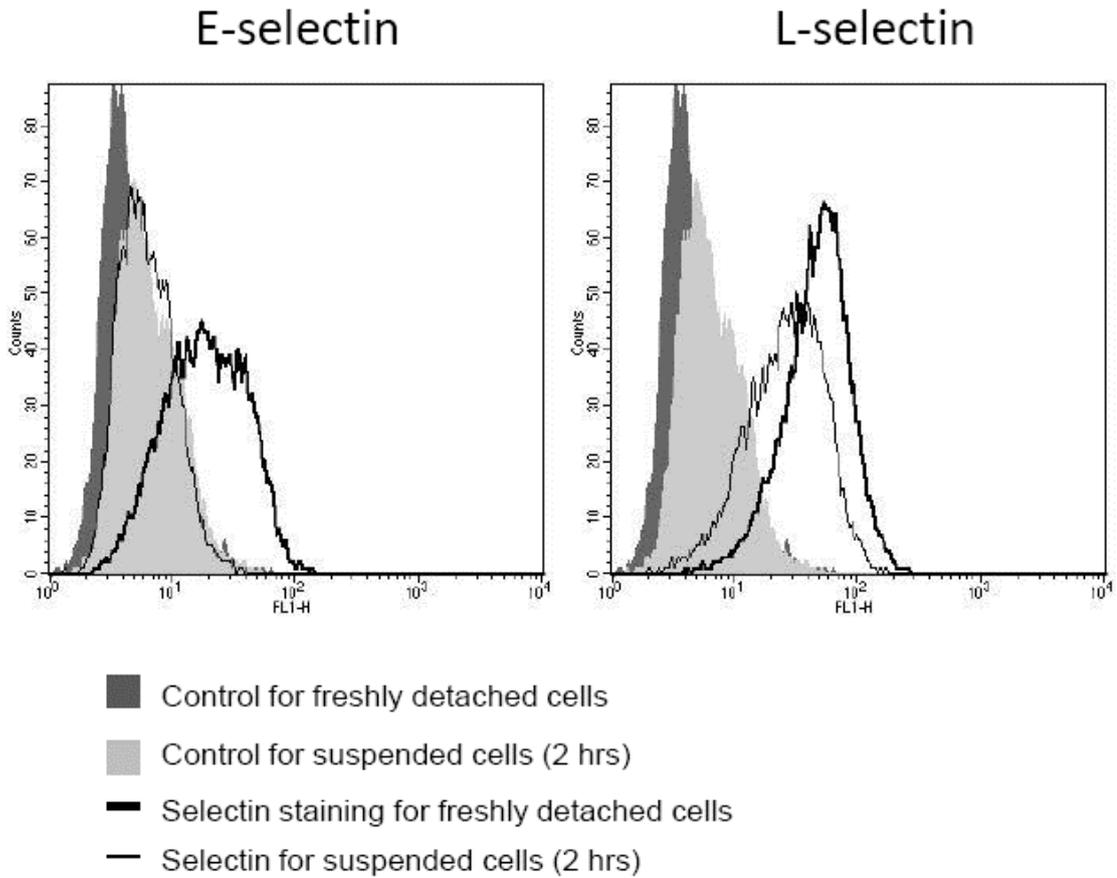


Figure S7

Selectins binding on MDA-MB-231 Effect of Glycosidases

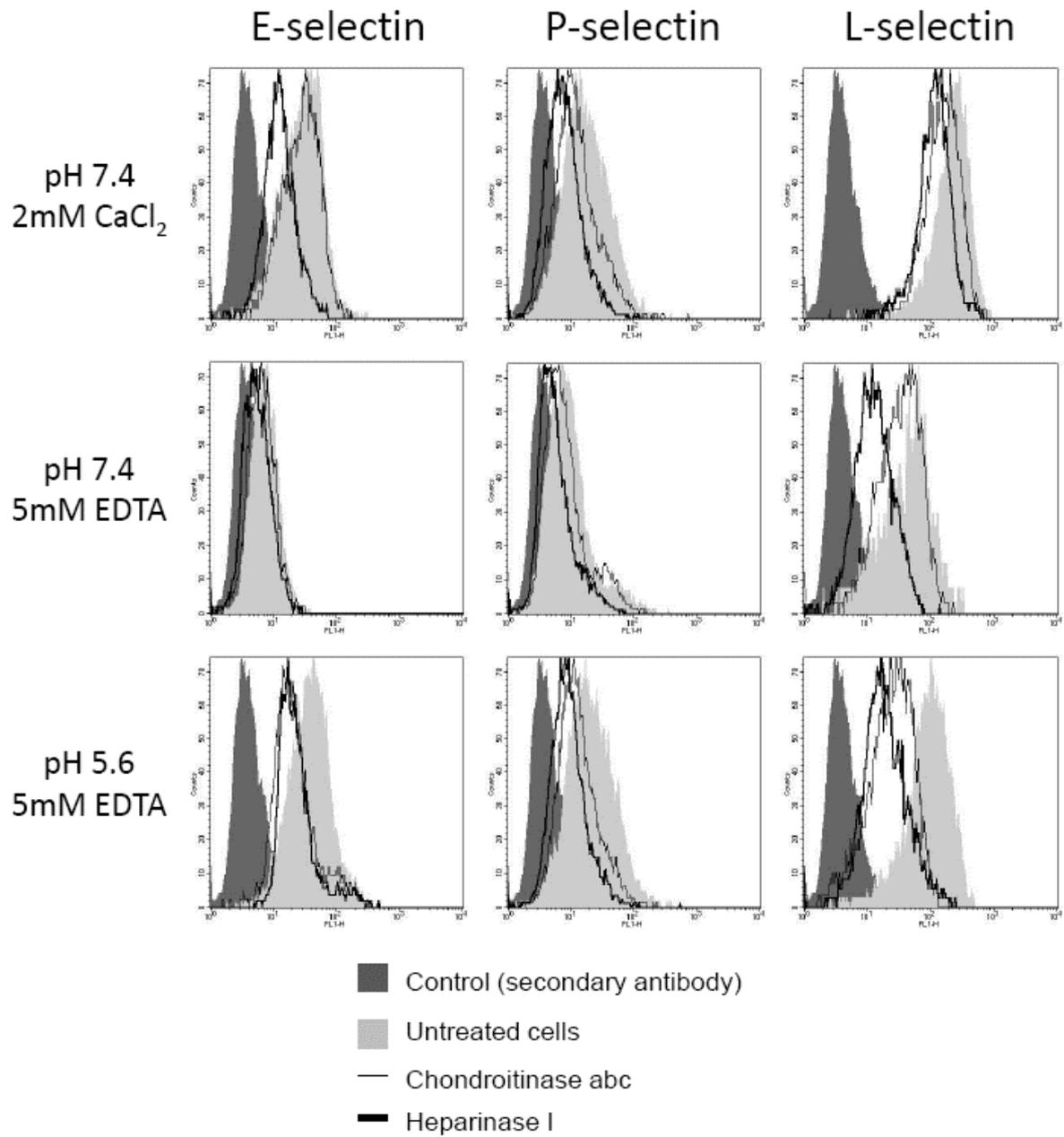


Figure S8

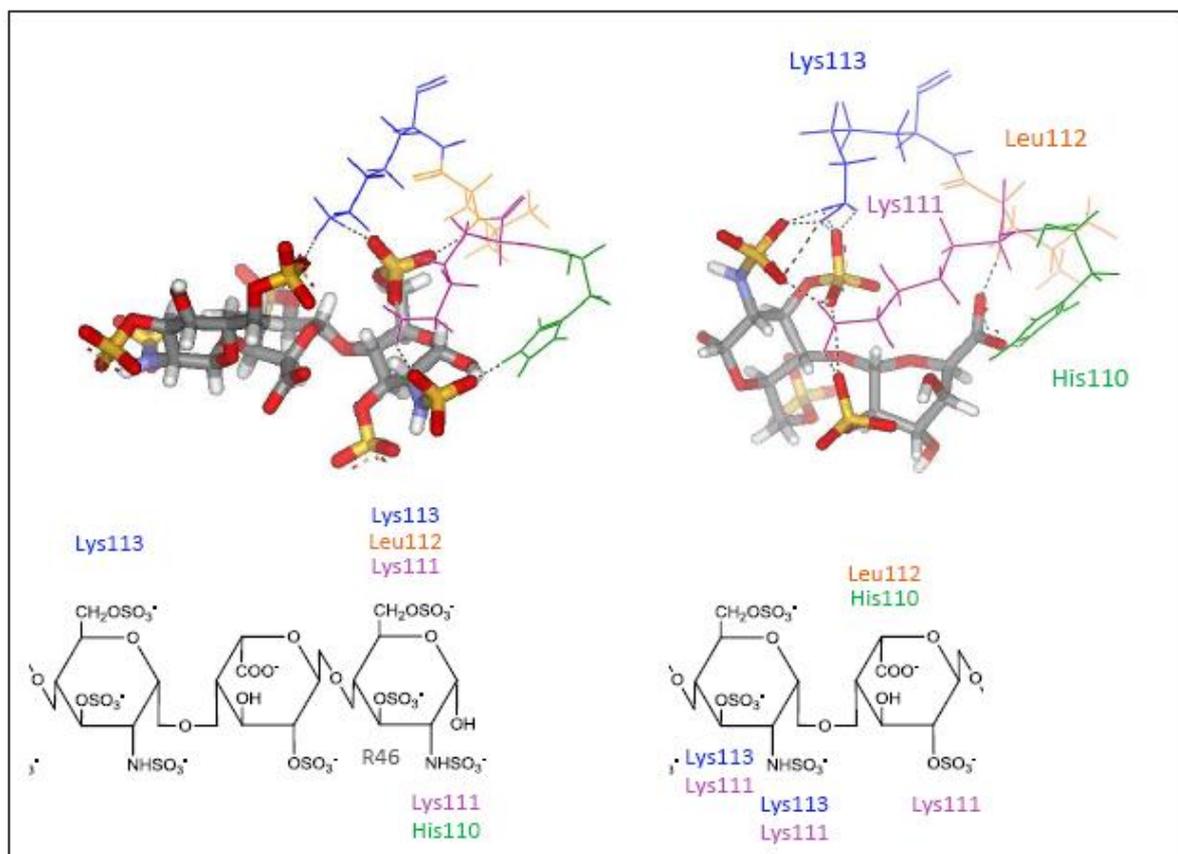
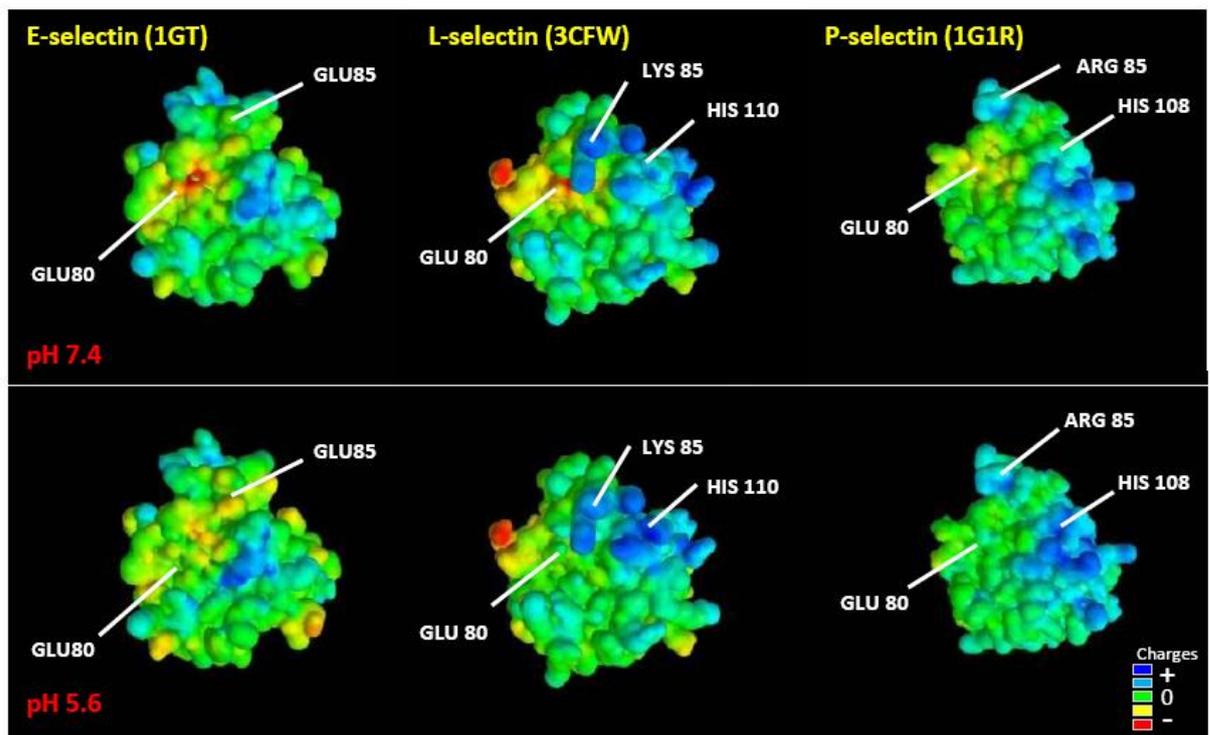


Figure S9



III. Discussion

Dans la première partie de nos travaux, nous avons analysé les caractéristiques des GAGs exprimés par trois lignées cellulaires issues de cancer du sein, MDA-MB-231, BT-20 et ZR-75-1. En premier lieu, nous avons dosé la quantité et le taux de sulfatation des chaînes HS et CS exprimées par ces différentes lignées. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie consistant à extraire spécifiquement les HS et les CS, puis à combiner un dosage au carbazole des acides uroniques et un dosage au DMMB, composé qui réagit en fonction du taux de sulfatation des GAGs. Ainsi, nous avons pu déterminer le taux de sulfatation relatif des GAGs dans les trois lignées cellulaires. Nos résultats montrent que la lignée MDA-MB-231 exprime des GAGs plus sulfatés que les deux autres lignées.

Nous avons alors analysé l'expression des sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse des GAGs. Par rapport aux deux autres lignées, la lignée MDA-MB-231 présente de fortes expressions de plusieurs sulfotransférases agissant dans la biosynthèse des CS : la CHST11, à l'origine de la biosynthèse des CS-A, les CHST3 et CHST7, qui produisent les CS-C et enfin la CHST15 qui génère les CS-E. Certaines enzymes impliquées dans la modification des HS sont également surexprimées dans la lignée MDA-MB-231 : c'est le cas des NDST1, HS3ST1 et HS3ST3B. Ces derniers résultats sont en accord avec le dosage des HS dans les cellules MDA-MB-231, puisque nous avons montré que ces derniers ont un taux de sulfatation supérieur à celui des deux autres lignées.

La fixation des sélectines sur nos cellules cancéreuses a été analysée par cytométrie en flux à l'aide de formes recombinantes fluorescentes. Comme il avait été reporté que les sélectines lient le sLeX et les CS seulement en présence de calcium (Kawashima et al., 2000), nous avons réalisé nos expériences soit en présence de CaCl_2 , soit après chélation par l'EDTA. De plus, il avait été démontré que des valeurs de pH subphysiologiques inhibent la fixation du sLeX mais augmentent celle des CS (Hirose et al., 2011). Nous avons donc réalisé certaines de nos incubations à pH 5,6. En utilisant ces différentes conditions, nous avons montré que toutes les sélectines se fixent sur la lignée MDA-MB-231 à pH physiologique, mais avec des intensités variables (L>P>E). Comme attendu, la fixation est inhibée de plus de 50% en présence d'EDTA. En revanche, la fixation à pH acide et en présence d'EDTA n'est pas modifiée par rapport à celle observée à pH physiologique et en présence de CaCl_2 . Ces données suggèrent que l'affinité des GAGs pour les sélectines est renforcée à pH acide. La fixation des sélectines sur les deux autres lignées cellulaires suit les mêmes tendances, même si l'amplitude des effets induits par la présence d'EDTA ou par le pH acide est plus faible. Toutefois, ce résultat était

attendu, puisque les différences sont corrélées aux taux de sulfatation des GAGs sur les cellules des trois lignées. Afin de s'assurer que la fixation des sélectines sur les lignées cellulaires est due à la présence des GAGs, nous avons traité les MDA-MB-231 avec différentes enzymes de dégradation des GAGs. Nous avons ainsi mis en évidence que les HS sont les ligands préférentiels de la P-sélectine. Les CS participent aussi à la fixation, mais dans une moindre mesure, puisque la diminution est plus faible après traitement par la chondroïtinase ABC. Finalement, nous avons vérifié que le sLeX n'est pas impliqué dans ces conditions, puisque le traitement des cellules par la sialidase ne modifie pas la fixation de la P-sélectine. Ces résultats sont cependant en contradiction avec ceux d'une autre étude qui avait montré que seuls les CS portés par les cellules cancéreuses interagissent avec la P-sélectine (Monzavi-Karbassi et al., 2007). Toutefois, ces différences sont probablement liées au fait que les auteurs avaient utilisé l'héparinase III, qui cible spécifiquement les domaines peu sulfatés des HS, alors que nous avons utilisé l'héparinase I spécifique des zones NS fortement sulfatées.

De nombreuses études ont décrit le rôle des plaquettes dans la formation de métastases (Coupland et al., 2014). En effet, les plaquettes interagissent avec les cellules cancéreuses circulantes, créant ainsi des amas cellulaires qui facilitent l'arrêt dans les organes distants en favorisant les interactions avec l'endothélium. L'implication de la P-sélectine portée par les plaquettes a également été établie dans différents modèles. Il a par exemple été montré que des souris déficientes en P-sélectine présentent un taux réduit de métastases par rapport aux souris contrôles. De plus, l'héparine est capable d'inhiber les interactions entre la P-sélectine et ses ligands exprimés par les cellules cancéreuses, ce qui conduit à une réduction des métastases (Borsig et al., 2001). En utilisant nos lignées cellulaires, nous avons montré que les plaquettes sont capables de se fixer aux cellules cancéreuses *via* les GAGs, ce qui est en accord avec des études antérieures (Cooney et al., 2011). Dans notre étude, la fixation des plaquettes sur les cellules cancéreuses est augmentée à pH acide et en absence de calcium, des conditions qui sont favorables à la fixation des GAGs mais qui empêchent la fixation du sLeX (Hirose et al., 2011). Le pH utilisé (pH 5,6) n'est pas physiologique mais peut être rencontré dans certaines conditions pathologiques, comme l'inflammation ou l'hypoxie. Par conséquent, un pH acide retrouvé en conditions pathologiques pourrait conduire au recrutement de cellules cancéreuses *via* des interactions GAGs/sélectines. L'engagement des GAGs constitue donc probablement une voie complémentaire à celle du sLeX par laquelle les cellules cancéreuses interagissent avec les plaquettes et les leucocytes circulants, favorisant ainsi leur arrêt sur l'endothélium et la formation de métastases.

Nous avons montré que l'expression des enzymes CHST11 et CHST14, à l'origine de la formation des CS-A, est augmentée dans les cellules issues de lignées cancéreuses du sein. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une autre étude montrant l'importance de la 4-*O*-sulfatation des CS dans l'apparition de métastases *in vivo*. Sur la base de leurs travaux, les auteurs en avaient conclu que les CS-A seraient impliqués dans ce processus (Cooney et al., 2011). Cependant, les résultats obtenus lors de notre étude montrent que la fixation des sélectines est favorisée par des taux élevés de sulfatation des GAGs. De même, une autre étude avait montré que les CS-E ont une meilleure affinité pour les sélectines que les CS-A (Kawashima et al., 2002). Il est donc probable que les CS-E soient plutôt impliqués dans la fixation des sélectines. Nous avons d'ailleurs mis en évidence que la lignée MDA-MB-231, qui fixe le mieux les sélectines, a une forte expression de la CHST15, une enzyme clé dans la formation des CS-E. Toutefois, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'expression de cette enzyme et l'apparition de métastases distantes. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour conclure quant à son implication dans ce processus. En revanche, nous avons montré que la NDST1 et de la HS3ST1 sont surexprimées dans la lignée MDA-MB-231. Ce résultat est en accord avec une étude précédente, qui a établi une corrélation entre l'expression de ces deux enzymes et l'apparition de métastases chez des patientes atteints de cancers du sein (Julien et al., 2011). Des études complémentaires prenant en compte les différents sous-types de cancers du sein sont maintenant nécessaires pour décrypter les mécanismes liés aux interactions GAGs/sélectines et ainsi développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Enfin, la dernière partie de cette étude a été consacrée à la modélisation moléculaire de l'interaction sélectine/GAGs. Afin de mieux comprendre les interactions et obtenir un modèle permettant d'expliquer les résultats expérimentaux, quatre hexamères de GAGs, correspondant à des structures de type CS-A, CS-E, héparine et héparine 3-*O*-sulfatée, ont été utilisés comme ligands de chaque sélectine. Les expériences de modélisation ont été réalisées soit à pH physiologique, soit à pH 5,6, en prenant en compte l'état de protonation des acides aminés des sélectines. Les résultats obtenus montrent une meilleure affinité de la L-sélectine pour les GAGs, alors que les deux autres sélectines présentent des affinités similaires, ce qui est en accord avec les tests de fixation réalisés sur les lignées cellulaires. De plus, dans notre modèle, la protonation des sélectines à pH acide augmente l'affinité des sélectines pour les GAGs, d'une manière dépendante du taux de sulfatation. Dans leur ensemble, ces prédictions correspondent aux conditions de fixation des plaquettes et des sélectines mesurées expérimentalement. Ainsi, le site de fixation des GAGs sur les sélectines serait localisé au niveau de la région CRD qui englobe aussi la zone de fixation du motif sLeX.

Cette étude de modélisation moléculaire nous a également permis d'identifier les acides aminés des sélectines potentiellement impliqués dans l'interaction. Bien que nous ayons échoué à définir un site de liaison simple et unique, en raison de la grande hétérogénéité des modèles obtenus, l'analyse des interactions dans les six meilleurs modèles obtenus pour chaque série nous a permis d'identifier trois groupes d'acides aminés basiques (84-87, 97-100 et 110-113) paraissant essentiels pour la fixation des GAGs. La L-sélectine possède ces trois groupes d'acides aminés. En revanche, la E-sélectine ne contient pas le groupe 84-87, et la P-sélectine ne contient pas le groupe 97-100. Ces différences pourraient être à l'origine des variations d'affinités prédites par nos modèles. Nous avons également observé que les groupements sulfates qui engagent le plus de liaisons hydrogènes avec les sélectines sont localisés sur les quatre monosaccharides centraux des hexamères utilisés, ce qui est en accord avec une ancienne étude qui avait montré qu'un tétrasaccharide est suffisant pour la liaison aux sélectines (Nelson et al., 1993).

Pour conclure, cette étude a fourni de nouvelles preuves expérimentales montrant que les GAGs exprimés par les cellules cancéreuses sont de bons ligands des sélectines et qu'ils pourraient participer au processus métastatique. L'analyse des données de modélisation moléculaire nous a également permis de proposer un modèle d'interaction expliquant la fixation différentielle des GAGs sur les sélectines, la compétition avec le motif sLeX, ainsi que l'effet de la baisse de pH sur l'affinité des GAGs pour les sélectines. Ces données pourraient donc servir à la conception *in silico* d'inhibiteurs potentiels des sélectines, ce qui pourrait avoir des applications dans le développement des traitements anti-métastatiques.

Conclusion générale

Les protéoglycanes membranaires sont composés d'un core protéique ancré à la membrane des cellules, sur lequel sont liés des chaînes de GAGs, de type HS ou CS/DS. Ces polysaccharides linéaires et sulfatés sont formés par la répétition d'unités disaccharidiques comprenant un acide uronique (GlcUA ou IdoUA) et un résidu d'hexosamine, GlcN pour les HS et GalNAc pour les CS/DS. Ces derniers peuvent être sulfatés en position C4 ou C6 des résidus de GalNAc, ainsi qu'en position C2 de l'acide uronique. Ils diffèrent par la nature des acides uroniques qui les composent, GlcUA pour les CS et les deux formes GlcUA/IdoUA pour les DS. Les HS, quant à eux, possèdent une organisation structurale encore plus complexe. Les résidus de GlcN peuvent être *N*-acétylés, *N*-sulfatés ou plus rarement présenter un groupement amine non substitué. Ils peuvent également être sulfatés en position C6 et C3 de ce même résidu, ainsi qu'en position C2 de l'acide uronique qui peut être un résidu GlcUA ou IdoUA. Plus d'une vingtaine de disaccharides HS différents ont été identifiés à ce jour, témoignant de la large diversité structurale de ces molécules. En sus de cette micro-hétérogénéité liée au positionnement des groupements sulfates sur les disaccharides, les chaînes HS se caractérisent par l'alternance de domaines fortement modifiés, dénommés NS et présentant des taux élevés d'épimérisation et de sulfatations, de domaines peu ou non modifiés appelés NA, et de domaines intermédiaires de transition, ce qui ajoute un degré de complexité supplémentaire (Lauder, 2009; Shriver et al., 2012). La large diversité structurale des GAGs est liée à des mécanismes de biosynthèse hautement régulés, qui font intervenir un grand nombre d'enzymes : glycosyl-transférases, polymérases, épimérases, sulfotransférases et endosulfatases (Esko et al., 2002; Mikami et al., 2013b).

La majorité des fonctions biologiques des protéoglycanes est imputable à leurs parties glycaniques qui, en raison de leur large diversité structurale, sont à même d'engager des interactions avec de nombreux ligands protéiques. A ce jour, plus de 500 protéines capables de lier les GAGs ont été identifiées. Parmi elles, on retrouve des protéines de signalisation (facteurs de croissance, cytokines, morphogènes), des molécules d'adhérence, des enzymes, ou encore des protéines portées par des pathogènes. *Via* ces nombreuses interactions, les GAGs et plus généralement les protéoglycanes, participent à la régulation de nombreux processus physiologiques, tels que la prolifération, l'adhérence, la migration ou encore la différenciation cellulaires. Les interactions entre les GAGs et leurs ligands sont très souvent spécifiques et dépendent des caractéristiques structurales de motifs glycaniques, que ce soit du point de vue de leur nature de type HS ou CS/DS, de leur taille ou de leur schéma de sulfatation.

Une étude antérieure avait montré que L'IL-4 se lie avec une forte affinité à l'héparine et que cette interaction peut être déplacée en présence d'HS ou de CS/DS. Selon cette étude,

l'affinité entre la cytokine et les GAGs de type HS, DS et CS-C est élevée, mais moindre pour les CS-A (Lortat-Jacob et al., 1997). Plus récemment, une autre étude a reporté que la différenciation *in vitro* des monocytes en cellules dendritiques est dépendante de la présence de GAGs membranaires. En utilisant différentes approches expérimentales, les auteurs concluent que l'activité de l'IL-4 est dépendante de l'interaction avec des GAGs *O*-sulfatés présents à la surface des monocytes (den Dekker et al., 2008).

Outre sa propriété à induire la différenciation des cellules dendritiques, l'IL-4 participe à de nombreux autres mécanismes physiologiques. Elle est essentiellement connue pour son rôle central dans la mise en place des réponses immunes de type 2. Elle est donc indispensable dans la lutte contre les parasites et intervient dans de nombreuses pathologies pulmonaires, comme l'asthme et les allergies (Luzina et al., 2012). Il a longtemps été considéré que la polarisation de la réponse immune concernait les lymphocytes T auxiliaires. En réponse à l'environnement cytokinique, ces lymphocytes acquièrent des phénotypes distincts et contrôlent ainsi la mise en place de la réponse immune la mieux adaptée à l'agression. Toutefois, il a été montré que la plupart des cellules du système immunitaire peuvent également acquérir différents phénotypes en réponse à leur environnement, et ainsi participer à la mise en place des réponses ciblées. Ainsi, la polarisation des macrophages suscite un intérêt grandissant ces dernières années. En présence d'IFN- γ et d'agonistes des TLRs, ces cellules acquièrent un phénotype pro-inflammatoire classique, de type M1. Par contre, ils se différencient selon un mode alternatif M2 en présence d'IL-4 et/ou d'IL-13 (Martinez et al., 2008). Ainsi, l'action de l'IL-4 sur les macrophages leur confère une forte capacité de résolution de l'inflammation et de remodelage tissulaire. En condition physiologique normale, ces macrophages M2 ont donc un rôle majeur dans le retour à l'homéostasie tissulaire après un événement inflammatoire. En revanche, leur présence peut être délétère dans différentes pathologies, et notamment dans de nombreux types de cancers. En effet, lors de l'établissement d'une tumeur solide, de nombreux macrophages s'infiltrent dans la masse tumorale. Plusieurs facteurs dérivés de la tumeur, dont l'IL-4, sont alors capables d'induire leur activation M2. Dans ce contexte, ils perdent leur capacité à lutter contre la croissance tumorale et acquièrent des propriétés tolérogènes, favorisant la progression des cellules tumorales ainsi que leur échappement au système immunitaire (Galdiero et al., 2013; Wang et al., 2010).

Sur la base de ces observations, la première partie de ma thèse a porté sur le rôle des GAGs membranaires dans la polarisation M2 des macrophages induite par l'IL-4. Pour cela, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de macrophages primaires différenciés à partir de monocytes isolés de sang humain. Afin de vérifier la participation des GAGs dans les réponses

induites par l'IL-4, nous avons utilisé un inhibiteur de biosynthèse des GAGs ainsi que des enzymes de dégradation agissant spécifiquement sur les HS ou les CS/DS. Ces premières expériences nous ont permis de montrer que les deux types de GAGs sont impliqués dans l'activité pro-M2 de l'IL-4. En effet, nos résultats indiquent que les HS mais également les CS/DS sont capables de potentialiser l'action de l'IL-4 sur ses cellules-cibles. Dans ce cas précis, la nature du GAGs ne semble donc pas déterminante, ce qui suggère que l'interaction serait plutôt dépendante du positionnement et/ou de la densité en groupements sulfates.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons choisi d'inhiber spécifiquement l'expression de certaines sulfotransférases par ARN interférence, de façon à obtenir des macrophages produisant des GAGs de surface avec des défauts de sulfatation. Les résultats obtenus montrent que l'activité de l'IL-4 serait dépendante de la *N*- et de la 6-*O*-sulfatation des HS, ainsi que de la 6-*O*-sulfatation, et particulièrement la 4,6-*O*-sulfatation des CS. En revanche, pour les deux types de GAGs, la 2-*O*-sulfatation ne semble pas participer à l'activité de la cytokine, puisque l'inactivation des deux 2-OST n'affecte pas l'expression des marqueurs M2 induite par l'IL-4.

Nous avons également montré que des oligosaccharides solubles sont efficaces pour inhiber la polarisation M2 des macrophages induite par l'IL-4. Ces données suggèrent que des molécules dérivées des GAGs pourraient être utilisées dans les pathologies où les macrophages M2 sont impliqués. Toutefois, une caractérisation plus précise de la liaison entre l'IL-4 et les GAGs est nécessaire pour mieux caractériser les paramètres de l'interaction et développer des molécules spécifiques. Dans cette optique, nous avons réalisé une analyse des complexes par modélisation moléculaire. Celle-ci nous a permis de confirmer l'importance de la 6-*O*-sulfatation des GAGs mais également d'identifier les acides aminés potentiellement impliqués dans la liaison à l'IL-4. Nous avons alors décidé de produire l'IL-4 recombinante ainsi que plusieurs mutants modifiés par mutagenèse dirigée au niveau des acides aminés identifiés. La production est actuellement en cours d'optimisation, de façon à obtenir des protéines recombinantes en quantité et avec un taux de pureté suffisants pour les études d'interaction et les tests cellulaires.

En fonction des conditions physiopathologiques, les cellules sont capables de modifier le profil de leur GAGs de surface, de façon à répondre au mieux à leur environnement. Ainsi, en fonction de l'état d'activation et de différenciation de la cellule, l'expression des enzymes de biosynthèse des GAGs peut être modifiée, ce qui conduit à un remodelage de la structure des GAGs produits. La synthèse des HS et CS/DS commence par la production d'un noyau tétrasaccharidique commun. Il y a ensuite polymérisation des polysaccharides précurseurs, par

ajout successif de GlcUA et de GlcNAc pour les HS, et de GlcUA et de GalNAc pour les CS/DS. Ces précurseurs subissent ensuite les étapes d'épimérisation et de sulfatations nécessaires à l'obtention des polysaccharides finaux, grâce à l'action de plus de trente enzymes différentes. Bien que toutes les enzymes impliquées dans la biosynthèse des GAGs aient été identifiées et caractérisées, les mécanismes qui régulent leur expression et leur activité dans les cellules sont encore mal connus.

Nous avons vu que les macrophages peuvent subir deux types d'activation, qui sont chacune accompagnée d'une régulation différentielle de nombreux métabolismes. Cependant, les variations affectant les voies de biosynthèse des GAGs n'ont jamais été étudiées dans ce modèle. Dans ce contexte, la seconde partie de ma thèse a été consacrée à l'étude des possibles modifications subies par les GAGs et leur machinerie de biosynthèse lors de la polarisation de ces cellules.

Nous avons ainsi montré que l'expression de plusieurs HS sulfotransférases est largement modifiée par la polarisation des macrophages. En effet, l'expression des NDST1 et NDST2 est augmentée lors de l'activation M1 des macrophages, alors que celle de HS2ST est fortement réduite. Plusieurs isoformes des HS3ST sont également impactées par la polarisation. Alors que l'activation M1 augmente l'expression de HS3ST3B, elle réprime celle des HS3ST1 et HS3ST2. A l'inverse, l'activation M2 induit une forte expression de HS3ST2. Le profil des sulfotransférases agissant sur les CS est également modifié lors de la polarisation des macrophages. Par exemple, la C4ST1 est largement représentée dans les macrophages M1, alors que la C4ST3 est uniquement exprimée dans les macrophages M2. De plus, l'UST est quasiment absente dans les macrophages M1, alors qu'elle est fortement exprimée dans les M2. La même variation d'expression est observée pour HS2ST, ce qui suggère que la 2-*O*-sulfatation des GAGs serait une caractéristique des macrophages M2. L'utilisation d'anticorps dirigés contre différents épitopes de GAGs nous a ensuite permis de confirmer que les variations d'expression des sulfotransférases conduisent effectivement à des modifications de la structure des GAGs.

Les GAGs 2-*O*-sulfatés ont été impliqués dans la fixation de nombreux facteurs de croissance (Ashikari-Hada et al., 2004). Afin de vérifier si les modifications structurales des GAGs sont associées à des fonctions différentes des macrophages, nous avons utilisé un système de co-culture dans lequel les macrophages polarisés ont été mis en contact avec les cellules d'une lignée cancéreuse. Ce système nous a permis de montrer que les GAGs portés par les macrophages M2 sont capables de présenter le FGF-2 aux cellules cancéreuses et ainsi induire leur prolifération. Dans son ensemble, cette étude a montré que la polarisation des

macrophages est accompagnée d'une modification des GAGs de surface, ce qui conforte l'idée que ces molécules jouent un rôle important dans la communication entre les cellules et leur environnement. Dans ce contexte, des études complémentaires devront permettre de confirmer le rôle de la 2-*O*-sulfatation dans la présentation du FGF-2 aux cellules cancéreuses et d'identifier les protéoglycanes impliqués dans ce mécanisme pro-tumoral.

En plus de leurs propriétés de fixation de médiateurs solubles et de présentation aux récepteurs de signalisation, les GAGs sont également impliqués dans l'interaction avec des protéines d'adhérence et la modulation des mécanismes de migration cellulaire. Nos travaux précédents indiquent que les GAGs des cellules immunes infiltrées dans les tumeurs peuvent subir des modifications structurales, par l'action de différents facteurs dérivés des tumeurs tels que l'IL-4. En outre, il est également bien connu que les GAGs des cellules cancéreuses elles-mêmes peuvent subir ce type de modifications structurales. C'est notamment le cas des cellules issues de cancers du sein, puisque plusieurs études ont reporté que les GAGs qu'elles portent peuvent servir de ligands aux sélectines et ainsi favoriser la formation de métastases. Toutefois, de nombreux points de désaccord subsistent, notamment sur l'identité des sélectines capables de lier les GAGs ou sur le type de GAGs impliqué dans les interactions.

La dernière partie de ma thèse a donc consisté à clarifier ces différents points. Ainsi, la caractérisation partielle des GAGs portés par plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et l'analyse de la fixation des sélectines E, L et P à leur surface nous ont permis de montrer que les GAGs (HS et CS/DS) sont de bons ligands pour les sélectines, particulièrement en cas de baisse de pH. De plus, la démonstration que les GAGs portés par les cellules cancéreuses sont capables d'engager des liaisons avec la P-sélectine exprimée par les plaquettes suggère que ces molécules pourraient avoir un rôle prépondérant dans l'établissement de métastases. Finalement, une étude par modélisation moléculaire nous a permis de proposer un modèle d'interaction qui pourrait servir à la recherche d'inhibiteurs des interactions entre les sélectines et leurs ligands, molécules potentiellement anti-métastatiques.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus confirment que la biosynthèse des GAGs peut être modulée en fonction des conditions inflammatoires, comme le montre notre étude sur la polarisation des macrophages. De plus, nous avons pu mettre en évidence que ces modifications structurales régulent les fonctions associées à ces molécules. En effet, nous avons montré que la structure des GAGs influe sur la fixation de l'IL-4 sur les macrophages non activés. Après leur polarisation M2, les macrophages acquièrent la capacité de présenter le FGF-2 aux cellules cancéreuses *via* la fixation du facteur de croissance sur leurs GAGs membranaires. Finalement, l'étude sur les sélectines montre qu'en fonction de leur structure et du taux de sulfatation, les

GAGs engagent des interactions différentes avec les sélectines, ce qui pourrait avoir un impact majeur sur la formation de métastases distantes. Ainsi, la modulation de l'activité des GAGs pourrait être une stratégie efficace pour lutter contre la progression tumorale. La recherche d'inhibiteurs spécifiques des sulfotransférases ou de molécules dérivées de GAGs devrait permettre de développer de nouveaux outils thérapeutiques pour lutter contre les cellules cancéreuses à différents stades de la progression tumorale.

Bibliographie

- Acuff, H.B., Carter, K.J., Fingleton, B., Gorden, D.L., Matrisian, L.M., 2006. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res.* 66, 259–266.
- Adhikari, N., Rusch, M., Mariash, A., Li, Q., Selleck, S.B., Hall, J.L., 2008. Alterations in heparan sulfate in the vessel in response to vascular injury in the mouse. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 1, 236–240.
- Afratis, N., Gialeli, C., Nikitovic, D., Tsegenidis, T., Karousou, E., Theocharis, A.D., Pavão, M.S., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., 2012. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* 279, 1177–1197.
- Ahn, G.-O., Tseng, D., Liao, C.-H., Dorie, M.J., Czechowicz, A., Brown, J.M., 2010. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 8363–8368.
- Aikawa, J., Grobe, K., Tsujimoto, M., Esko, J.D., 2001. Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4. *J. Biol. Chem.* 276, 5876–5882.
- Ai, X., Do, A.-T., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., Emerson, C.P., 2003. QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 162, 341–351.
- Alberts, B. (Ed.), 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th ed. ed. Garland Science, New York.
- Alexopoulou, A.N., Multhaupt, H.A.B., Couchman, J.R., 2007. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 505–528.
- Alini, M., Losa, G.A., 1991. Partial characterization of proteoglycans isolated from neoplastic and nonneoplastic human breast tissues. *Cancer Res.* 51, 1443–1447.
- Allavena, P., Mantovani, A., 2012. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 195–205.
- Almholt, K., Lund, L.R., Rygaard, J., Nielsen, B.S., Dane, K., Ramer, J., Johnsen, M., 2005. Reduced metastasis of transgenic mammary cancer in urokinase-deficient mice. *Int. J. Cancer* 113, 525–532.
- Al-Nedawi, K., 2014. The yin-yang of microvesicles (exosomes) in cancer biology. *Front. Oncol.* 4, 172.
- Ambrosino, E., Terabe, M., Halder, R.C., Peng, J., Takaku, S., Miyake, S., Yamamura, T., Kumar, V., Berzofsky, J.A., 2007. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 5126–5136.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G., Fais, S., 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.* 195, 1303–1316.
- Andreu, P., Johansson, M., Affara, N.I., Pucci, F., Tan, T., Junankar, S., Korets, L., Lam, J., Tawfik, D., DeNardo, D.G., Naldini, L., de Visser, K.E., De Palma, M., Coussens, L.M., 2010. FcRγ Activation Regulates Inflammation-Associated Squamous Carcinogenesis. *Cancer Cell* 17, 121–134.
- Aono, S., Tokita, Y., Shuo, T., Yamauchi, S., Matsui, F., Nakanishi, K., Hirano, K., Sano, M., Oohira, A., 2004. Glycosylation Site for Chondroitin Sulfate on the Neural Part-time Proteoglycan, Neuroglycan C. *J. Biol. Chem.* 279, 46536–46541.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F.J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J.-P., Chompret, A., Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., Bourhis, J., André, F., Delaloge, S., Tursz, T., Kroemer, G., Zitvogel, L., 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* 13, 1050–1059.
- Apetoh, L., Végran, F., Ladoire, S., Ghiringhelli, F., 2011. Restoration of antitumor immunity through selective inhibition of myeloid derived suppressor cells by anticancer therapies. *Curr. Mol. Med.* 11, 365–372.
- Aricò, E., Belardelli, F., 2012. Interferon-α as Antiviral and Antitumor Vaccine Adjuvants: Mechanisms of Action and Response Signature. *J. Interferon Cytokine Res.* 32, 235–247.

- Arnon, T.I., 2004. The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 103, 664–672.
- Aspberg, A., 2012. The Different Roles of Aggrecan Interaction Domains. *J. Histochem. Cytochem.* 60, 987–996.
- Axelsson, J., Xu, D., Na Kang, B., Nussbacher, J.K., Handel, T.M., Ley, K., Sriramarao, P., Esko, J.D., 2012. Inactivation of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase accentuates neutrophil infiltration during acute inflammation in mice. *Blood* 120, 1742–1751.
- Bai, X., Esko, J.D., 1996. An animal cell mutant defective in heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfation. *J. Biol. Chem.* 271, 17711–17717.
- Baljinnyam, E., Umemura, M., De Lorenzo, M.S., Iwatsubo, M., Chen, S., Goydos, J.S., Iwatsubo, K., 2011. Epac1 promotes melanoma metastasis via modification of heparan sulfate. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 680–687.
- Balkwill, F., Charles, K.A., Mantovani, A., 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211–217.
- Ball, S.G., Bayley, C., Shuttleworth, C.A., Kielty, C.M., 2010. Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochem. J.* 427, 29–40.
- Bame, K.J., 2001. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* 11, 91R–98R.
- Bame, K.J., Zhang, L., David, G., Esko, J.D., 1994. Sulphated and undersulphated heparan sulphate proteoglycans in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in N-sulphotransferase. *Biochem. J.* 303 (Pt 1), 81–87.
- Barbouri, D., Afratis, N., Gialeli, C., Vynios, D.H., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K., 2014. Syndecans as Modulators and Potential Pharmacological Targets in Cancer Progression. *Front. Oncol.* 4.
- Barragan, A., Spillmann, D., Carlson, J., Wahlgren, M., 1999. Role of glycans in Plasmodium falciparum infection. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 487–493.
- Basappa, null, Murugan, S., Sugahara, K.N., Lee, C.M., ten Dam, G.B., van Kuppevelt, T.H., Miyasaka, M., Yamada, S., Sugahara, K., 2009. Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells. *Glycobiology* 19, 735–742.
- Bauer, S., 1999. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science* 285, 727–729.
- Beatty, G.L., Chiorean, E.G., Fishman, M.P., Saboury, B., Teitelbaum, U.R., Sun, W., Huhn, R.D., Song, W., Li, D., Sharp, L.L., Torigian, D.A., O'Dwyer, P.J., Vonderheide, R.H., 2011. CD40 Agonists Alter Tumor Stroma and Show Efficacy Against Pancreatic Carcinoma in Mice and Humans. *Science* 331, 1612–1616.
- Bengtsson, J., Eriksson, I., Kjellén, L., 2003. Distinct effects on heparan sulfate structure by different active site mutations in NDST-1. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 2110–2115.
- Bennaceur, K., Chapman, J.A., Touraine, J.-L., Portoukalian, J., 2009. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1795, 16–24.
- Bennett, K.L., Jackson, D.G., Simon, J.C., Tanczos, E., Peach, R., Modrell, B., Stamenkovic, I., Plowman, G., Aruffo, A., 1995. CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J. Cell Biol.* 128, 687–698.
- Bergers, G., Benjamin, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., Hanahan, D., 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2, 737–744.
- Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J.M., Quintanilla, M., 2009. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 954–973.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., Zako, M., 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 729–777.
- Berzofsky, J.A., Terabe, M., 2009. The contrasting roles of NKT cells in tumor immunity. *Curr. Mol. Med.* 9, 667–672.
- Bespalov, M.M., Sidorova, Y.A., Tumova, S., Ahonen-Bishopp, A., Magalhães, A.C., Kuleskiy, E., Paveliev, M., Rivera, C., Rauvala, H., Saarma, M., 2011. Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J. Cell Biol.* 192, 153–169.

- Bethea, H.N., Xu, D., Liu, J., Pedersen, L.C., 2008. Redirecting the substrate specificity of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase by structurally guided mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18724–18729.
- Bezakova, G., Ruegg, M.A., 2003. New insights into the roles of agrin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 295–308.
- Bian, S., Akyüz, N., Bernreuther, C., Loers, G., Laczynska, E., Jakovcevski, I., Schachner, M., 2011. Dermatan sulfotransferase Chst14/D4st1, but not chondroitin sulfotransferase Chst11/C4st1, regulates proliferation and neurogenesis of neural progenitor cells. *J. Cell Sci.* 124, 4051–4063.
- Bilandzic, M., Chu, S., Farnworth, P.G., Harrison, C., Nicholls, P., Wang, Y., Escalona, R.M., Fuller, P.J., Findlay, J.K., Stenvers, K.L., 2009. Loss of betaglycan contributes to the malignant properties of human granulosa tumor cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 23, 539–548.
- Biroccio, A., Cherfils-Vicini, J., Augereau, A., Pinte, S., Bauwens, S., Ye, J., Simonet, T., Horard, B., Jamet, K., Cervera, L., Mendez-Bermudez, A., Poncet, D., Grataroli, R., de Rodenbeeke, C.T., Salvati, E., Rizzo, A., Zizza, P., Ricoul, M., Cognet, C., Kuilman, T., Duret, H., Lépinasse, F., Marvel, J., Verhoeyen, E., Cosset, F.-L., Peeper, D., Smyth, M.J., Londoño-Vallejo, A., Sabatier, L., Picco, V., Pages, G., Scoazec, J.-Y., Stoppacciaro, A., Leonetti, C., Vivier, E., Gilson, E., 2013. TRF2 inhibits a cell-extrinsic pathway through which natural killer cells eliminate cancer cells. *Nat. Cell Biol.* 15, 818–828.
- Bishop, J.R., Schuksz, M., Esko, J.D., 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446, 1030–1037.
- Bishop, J.R., Stanford, K.I., Esko, J.D., 2008. Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 307–313.
- Biswas, S.K., Mantovani, A., 2012. Orchestration of Metabolism by Macrophages. *Cell Metab.* 15, 432–437.
- Blank, C., Gajewski, T.F., Mackensen, A., 2005. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 54, 307–314.
- Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodaysky, I., Bovin, N.V., Porgador, A., 2004. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 2392–2401.
- Bohdanowicz, M., Grinstein, S., 2013. Role of Phospholipids in Endocytosis, Phagocytosis, and Macropinocytosis. *Physiol. Rev.* 93, 69–106.
- Bolat, F., Kayaselcuk, F., Nursal, T.Z., Yagmurdur, M.C., Bal, N., Demirhan, B., 2006. Microvessel density, VEGF expression, and tumor-associated macrophages in breast tumors: correlations with prognostic parameters. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 25, 365–372.
- Bonecchi, R., Galliera, E., Borroni, E.M., Corsi, M.M., Locati, M., Mantovani, A., 2009. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 540–551.
- Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, 657–670.
- Borsig, L., 2010. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. *Thromb. Res.* 125 Suppl 2, S66–71.
- Borsig, L., Wong, R., Feramisco, J., Nadeau, D.R., Varki, N.M., Varki, A., 2001. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3352–3357.
- Borsig, L., Wong, R., Hynes, R.O., Varki, N.M., Varki, A., 2002. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2193–2198.
- Bret, C., Hose, D., Reme, T., Sprynski, A.-C., Mahtouk, K., Schved, J.-F., Quittet, P., Rossi, J.-F., Goldschmidt, H., Klein, B., 2009. Expression of genes encoding for proteins involved in heparan sulphate and chondroitin sulphate chain synthesis and modification in normal and malignant plasma cells. *Br. J. Haematol.* 145, 350–368.
- Bronte, V., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Tosello, V., Mazzoni, A., Segal, D.M., Staib, C., Lowel, M., Sutter, G., Colombo, M.P., Zanovello, P., 2003. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 270–278.
- Bruchard, M., Ghiringhelli, F., 2014. [Tumor microenvironment: regulatory cells and immunosuppressive cytokines]. *Médecine Sci. MS* 30, 429–435.

- Brusilovsky, M., Cordoba, M., Rosental, B., Hershkovitz, O., Andrade, M.D., Pecherskaya, A., Einarson, M.B., Zhou, Y., Braiman, A., Campbell, K.S., Porgador, A., 2013. Genome-wide siRNA screen reveals a new cellular partner of NK cell receptor KIR2DL4: heparan sulfate directly modulates KIR2DL4-mediated responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 5256–5267.
- Brusilovsky, M., Radinsky, O., Yossef, R., Campbell, K.S., Porgador, A., 2014. Carbohydrate-Mediated Modulation of NK Cell Receptor Function: Structural and Functional Influences of Heparan Sulfate Moieties Expressed on NK Cell Surface. *Front. Oncol.* 4.
- Bui, C., Ouzzine, M., Talhaoui, I., Sharp, S., Prydz, K., Coughtrie, M.W.H., Fournel-Gigleux, S., 2010. Epigenetics: methylation-associated repression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase gene expression contributes to the invasive phenotype of H-EMC-SS chondrosarcoma cells. *FASEB J.* 24, 436–450.
- Bunt, S.K., Clements, V.K., Hanson, E.M., Sinha, P., Ostrand-Rosenberg, S., 2009. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J. Leukoc. Biol.* 85, 996–1004.
- Bunt, S.K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J., Ostrand-Rosenberg, S., 2007. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* 67, 10019–10026.
- Burg, M.A., Nishiyama, A., Stallcup, W.B., 1997. A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen. *Exp. Cell Res.* 235, 254–264.
- Burnet, F.M., 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 13, 1–27.
- Byrne, S.N., Halliday, G.M., 2003. High levels of Fas ligand and MHC class II in the absence of CD80 or CD86 expression and a decreased CD4+ T cell Infiltration, enables murine skin tumours to progress. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 52, 396–402.
- Cadwallader, A.B., Yost, H.J., 2006a. Combinatorial expression patterns of heparan sulfate sulfotransferases in zebrafish: II. The 6-O-sulfotransferase family. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 3432–3437.
- Cadwallader, A.B., Yost, H.J., 2006b. Combinatorial expression patterns of heparan sulfate sulfotransferases in zebrafish: I. The 3-O-sulfotransferase family. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 3423–3431.
- Caja, F., Vannucci, L., 2014. TGFβ: A player on multiple fronts in the tumor microenvironment. *J. Immunotoxicol.* 1–8.
- Camerer, E., Qazi, A.A., Duong, D.N., Cornelissen, I., Advincula, R., Coughlin, S.R., 2004. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 104, 397–401.
- Campadelli-Fiume, G., Amasio, M., Avitabile, E., Cerretani, A., Forghieri, C., Gianni, T., Menotti, L., 2007. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev. Med. Virol.* 17, 313–326.
- Campbell, K.S., Hasegawa, J., 2013. Natural killer cell biology: An update and future directions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 536–544.
- Cao, S., Yaqoob, U., Das, A., Shergill, U., Jagavelu, K., Huebert, R.C., Routray, C., Abdelmoneim, S., Vasdev, M., Leof, E., Charlton, M., Watts, R.J., Mukhopadhyay, D., Shah, V.H., 2010. Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF-beta signaling in hepatic stellate cells. *J. Clin. Invest.* 120, 2379–2394.
- Cao, W., 2009. Molecular Characterization of Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Clin. Immunol.* 29, 257–264.
- Cao, Y., Szabolcs, A., Dutta, S.K., Yaqoob, U., Jagavelu, K., Wang, L., Leof, E.B., Urrutia, R.A., Shah, V.H., Mukhopadhyay, D., 2010. Neuropilin-1 mediates divergent R-Smad signaling and the myofibroblast phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 31840–31848.
- Capila, I., Linhardt, R.J., 2002. Heparin-protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 41, 391–412.
- Carman, C.V., Springer, T.A., 2008. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 533–540.
- Carter, N.M., Ali, S., Kirby, J.A., 2003. Endothelial inflammation: the role of differential expression of N-deacetylase/N-sulphotransferase enzymes in alteration of the immunological properties of heparan sulphate. *J. Cell Sci.* 116, 3591–3600.

- Catros, V., Toutirais, O., Bouet, F., Cabillic, F., Desille, M., Fournié, J.-J., 2010. Lymphocytes Tγδ en cancérologie: Des lymphocytes tueurs non conventionnels. *médecine/sciences* 26, 185–192.
- Cattaruzza, S., Ozerdem, U., Denzel, M., Ranscht, B., Bulian, P., Cavallaro, U., Zanocco, D., Colombatti, A., Stallcup, W.B., Perris, R., 2013. Multivalent proteoglycan modulation of FGF mitogenic responses in perivascular cells. *Angiogenesis* 16, 309–327.
- Cerwenka, A., Baron, J.L., Lanier, L.L., 2001. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 11521–11526.
- Chalkiadaki, G., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Sifaki, M., Krasagakis, K., Katonis, P., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N., 2009. Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1323–1331.
- Chambers, A.F., Naumov, G.N., Varghese, H.J., Nadkarni, K.V., MacDonald, I.C., Groom, A.C., 2001. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 10, 243–255, vii.
- Chan, C.W., Housseau, F., 2008. The “kiss of death” by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ.* 15, 58–69.
- Chandrasekaran, E.V., Davidson, E.A., 1979. Glycosaminoglycans of normal and malignant cultured human mammary cells. *Cancer Res.* 39, 870–880.
- Chang, M.Y., Olin, K.L., Tsoi, C., Wight, T.N., Chait, A., 1998. Human monocyte-derived macrophages secrete two forms of proteoglycan-macrophage colony-stimulating factor that differ in their ability to bind low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 273, 15985–15992.
- Chargui, J., Combaret, V., Scaglione, V., Iacono, I., Péri, V., Valteau-Couanet, D., Dubrel, M., Angevin, E., Puisieux, A., Romagne, F., Bergeron, C., 2010. Bromohydrin pyrophosphate-stimulated Vgamma9delta2 T cells expanded ex vivo from patients with poor-prognosis neuroblastoma lyse autologous primary tumor cells. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 33, 591–598.
- Chen, C.-P., Liu, S.-H., Lee, M.-Y., Chen, Y.-Y., 2008. Heparan sulfate proteoglycans in the basement membranes of the human placenta and decidua. *Placenta* 29, 309–316.
- Chen, E., Hermanson, S., Ekker, S.C., 2004. Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. *Blood* 103, 1710–1719.
- Cheng, F., Mani, K., van den Born, J., Ding, K., Belting, M., Fransson, L.-A., 2002. Nitric oxide-dependent processing of heparan sulfate in recycling S-nitrosylated glypican-1 takes place in caveolin-1-containing endosomes. *J. Biol. Chem.* 277, 44431–44439.
- Cheng, K., Xie, G., Raufman, J.-P., 2007. Matrix metalloproteinase-7-catalyzed release of HB-EGF mediates deoxycholytaurine-induced proliferation of a human colon cancer cell line. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1001–1012.
- Chen, J., Liu, J., 2005. Characterization of the structure of antithrombin-binding heparan sulfate generated by heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 5. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1725, 190–200.
- Chen, R.L., Lander, A.D., 2001. Mechanisms underlying preferential assembly of heparan sulfate on glypican-1. *J. Biol. Chem.* 276, 7507–7517.
- Chen, S., Birk, D.E., 2013. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. *FEBS J.* 280, 2120–2137.
- Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Türeci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., Old, L.J., 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1914–1918.
- Chen, Z., Freedman, M.S., 2008. Correlation of specialized CD16(+) gammadelta T cells with disease course and severity in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 194, 147–152.
- Cheung, W.F., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., Lindhal, U., Kjellén, L., 1996. Expression of the mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/ N-sulfotransferase in human kidney 293 cells results in increased N-sulfation of heparan sulfate. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 5250–5256.
- Choi, S., Lee, H., Choi, J.R., Oh, E.S., 2010. Shedding; towards a new paradigm of syndecan function in cancer. *BMB Rep.* 43, 305–310.
- Christianson, H.C., Belting, M., 2014. Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 35, 51–55.

- Christianson, H.C., Svensson, K.J., van Kuppevelt, T.H., Li, J.-P., Belting, M., 2013. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17380–17385.
- Clasper, S., Vekemans, S., Fiore, M., Plebanski, M., Wordsworth, P., David, G., Jackson, D.G., 1999. Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action. *J. Biol. Chem.* 274, 24113–24123.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., Ravetch, J.V., 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6, 443–446.
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M.A., Vallejo, C., Martos, J.A., Moreno, M., 1997. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79, 2320–2328.
- Condeelis, J., Pollard, J.W., 2006. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell* 124, 263–266.
- Coombe, D.R., Kett, W.C., 2005. Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 410–424.
- Coombe, D.R., Stevenson, S.M., Kinnear, B.F., Gandhi, N.S., Mancera, R.L., Osmond, R.I.W., Kett, W.C., 2008. Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) and its interactions with glycosaminoglycans: 2. Biochemical analyses. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 4863–4875.
- Cooney, C.A., Jousheghany, F., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Gomes, T., Kieber-Emmons, A.M., Siegel, E.R., Suva, L.J., Ferrone, S., Kieber-Emmons, T., Monzavi-Karbassi, B., 2011. Chondroitin sulfates play a major role in breast cancer metastasis: a role for CSPG4 and CHST11 gene expression in forming surface P-selectin ligands in aggressive breast cancer cells. *Breast Cancer Res. BCR* 13, R58.
- Corso, S., Comoglio, P.M., Giordano, S., 2005. Cancer therapy: can the challenge be MET? *Trends Mol. Med.* 11, 284–292.
- Costello, R.T., 2002. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 99, 3661–3667.
- Cottreau, E., Mortemousque, I., Moizard, M.-P., Bürglen, L., Lacombe, D., Gilbert-Dussardier, B., Sigaudy, S., Boute, O., David, A., Faivre, L., Amiel, J., Robertson, R., Viana Ramos, F., Bieth, E., Odent, S., Demeer, B., Mathieu, M., Gaillard, D., Van Maldergem, L., Baujat, G., Maystadt, I., Héron, D., Verloes, A., Philip, N., Cormier-Daire, V., Frouté, M.-F., Pinson, L., Blanchet, P., Sarda, P., Willems, M., Jacquinet, A., Ratbi, I., Van Den Ende, J., Lackmy-Port Lis, M., Goldenberg, A., Bonneau, D., Rossignol, S., Toutain, A., 2013. Phenotypic spectrum of Simpson-Golabi-Behmel syndrome in a series of 42 cases with a mutation in GPC3 and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 163C, 92–105.
- Coupland, L.A., Chong, B.H., Parish, C.R., 2012. Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells. *Cancer Res.* 72, 4662–4671.
- Coupland, L.A., Parish, C.R., 2014. Platelets, Selectins, and the Control of Tumor Metastasis. *Semin. Oncol.* 41, 422–434.
- Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D., Werb, Z., 2000. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103, 481–490.
- Crawford, B.E., Olson, S.K., Esko, J.D., Pinhal, M.A., 2001. Cloning, Golgi localization, and enzyme activity of the full-length heparin/heparan sulfate-glucuronic acid C5-epimerase. *J. Biol. Chem.* 276, 21538–21543.
- Csordás, G., Santra, M., Reed, C.C., Eichstetter, I., McQuillan, D.J., Gross, D., Nugent, M.A., Hajnóczky, G., Iozzo, R.V., 2000. Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. *J. Biol. Chem.* 275, 32879–32887.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L., Zou, W., 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10, 942–949.
- Curti, A., Pandolfi, S., Valzasina, B., Aluigi, M., Isidori, A., Ferri, E., Salvestrini, V., Bonanno, G., Rutella, S., Durelli, I., Horenstein, A.L., Fiore, F., Massaia, M., Colombo, M.P., Baccarani, M.,

- Lemoli, R.M., 2007. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁻ into CD25⁺ T regulatory cells. *Blood* 109, 2871–2877.
- Curtis, N.J., Primrose, J.N., Thomas, G.J., Mirnezami, A.H., Ottensmeier, C.H., 2012. The adaptive immune response to colorectal cancer: from the laboratory to clinical practice. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 38, 889–896.
- Daniels, M.P., 2012. The role of agrin in synaptic development, plasticity and signaling in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 61, 848–853.
- D'Asaro, M., La Mendola, C., Di Liberto, D., Orlando, V., Todaro, M., Spina, M., Guggino, G., Meraviglia, S., Caccamo, N., Messina, A., Salerno, A., Di Raimondo, F., Vigneri, P., Stassi, G., Fourniè, J.J., Dieli, F., 2010. V gamma 9V delta 2 T lymphocytes efficiently recognize and kill zoledronate-sensitized, imatinib-sensitive, and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3260–3268.
- Deepa, S.S., Umehara, Y., Higashiyama, S., Itoh, N., Sugahara, K., 2002. Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J. Biol. Chem.* 277, 43707–43716.
- Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K.M., O'Malley, K.A., Wynn, J.L., Antonenko, S., Al-Quran, S.Z., Swan, R., Chung, C.-S., Atkinson, M.A., Ramphal, R., Gabrilovich, D.I., Reeves, W.H., Ayala, A., Phillips, J., Laface, D., Heyworth, P.G., Clare-Salzler, M., Moldawer, L.L., 2007. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J. Exp. Med.* 204, 1463–1474.
- Delehedde, M., Devenyns, L., Maurage, C.-A., Vivès, R.R., 2013. Endocan in cancers: a lesson from a circulating dermatan sulfate proteoglycan. *Int. J. Cell Biol.* 2013, 705027.
- Delehedde, M., Lyon, M., Gallagher, J.T., Rudland, P.S., Fernig, D.G., 2002a. Fibroblast growth factor-2 binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates a sustained phosphorylation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and proliferation of rat mammary fibroblasts. *Biochem. J.* 366, 235–244.
- Delehedde, M., Lyon, M., Sergeant, N., Rahmoune, H., Fernig, D.G., 2001. Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6, 253–273.
- Delehedde, M., Lyon, M., Vidyasagar, R., McDonnell, T.J., Fernig, D.G., 2002b. Hepatocyte growth factor/scatter factor binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates the proliferation of human HaCaT keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 12456–12462.
- Delehedde, M., Seve, M., Sergeant, N., Wartelle, I., Lyon, M., Rudland, P.S., Fernig, D.G., 2000. Fibroblast growth factor-2 stimulation of p42/44MAPK phosphorylation and IkappaB degradation is regulated by heparan sulfate/heparin in rat mammary fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 275, 33905–33910.
- 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.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., Coussens, L.M., 2009. CD4⁺ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell* 16, 91–102.
- DeNardo, D.G., Johansson, M., Coussens, L.M., 2008. Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 27, 11–18.
- Den Dekker, E., Grefte, S., Huijs, T., ten Dam, G.B., Versteeg, E.M.M., van den Berk, L.C.J., Bladergroen, B.A., van Kuppevelt, T.H., Figdor, C.G., Torensma, R., 2008. Monocyte cell surface glycosaminoglycans positively modulate IL-4-induced differentiation toward dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 3680–3688.
- De Palma, M., Veneri, M.A., Galli, R., Sergi, L.S., Politi, L.S., Sampaolesi, M., Naldini, L., 2005. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8, 211–226.
- Desgrosellier, J.S., Cheresch, D.A., 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10, 9–22.

- De Smet, C., Lurquin, C., Lethé, B., Martelange, V., Boon, T., 1999. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7327–7335.
- De Visser, K.E., Eichten, A., Coussens, L.M., 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 6, 24–37.
- De Visser, K.E., Korets, L.V., Coussens, L.M., 2005. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 7, 411–423.
- Dhar, K., Dhar, G., Majumder, M., Haque, I., Mehta, S., Van Veldhuizen, P.J., Banerjee, S.K., Banerjee, S., 2010. Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1. *Mol. Cancer* 9, 209.
- Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., Murphy, K.M., Schreiber, R.D., 2011. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* 208, 1989–2003.
- Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., Raulet, D.H., 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413, 165–171.
- Dietrich, A., Tanczos, E., Vanscheidt, W., Schöpf, E., Simon, J.C., 1997. High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 33, 926–930.
- Dixon, J., Loftus, S.K., Gladwin, A.J., Scambler, P.J., Wasmuth, J.J., Dixon, M.J., 1995. Cloning of the human heparan sulfate-N-deacetylase/N-sulfotransferase gene from the Treacher Collins syndrome candidate region at 5q32-q33.1. *Genomics* 26, 239–244.
- Do, A.-T., Smeds, E., Spillmann, D., Kusche-Gullberg, M., 2006. Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferases in human embryonic kidney 293 cells results in increased N-acetylglucosaminyl 6-O-sulfation. *J. Biol. Chem.* 281, 5348–5356.
- Dolcetti, L., Marigo, I., Mantelli, B., Peranzoni, E., Zanovello, P., Bronte, V., 2008. Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett.* 267, 216–225.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., Chen, L., 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793–800.
- Dong, S., Cole, G.J., Halfter, W., 2003. Expression of collagen XVIII and localization of its glycosaminoglycan attachment sites. *J. Biol. Chem.* 278, 1700–1707.
- Doubrovina, E.S., Doubrovin, M.M., Vider, E., Sisson, R.B., O'Reilly, R.J., Dupont, B., Vyas, Y.M., 2003. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 6891–6899.
- Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D., Worch, H., 2006. Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules* 7, 2388–2393.
- Duncan, M.B., Chen, J., Krise, J.P., Liu, J., 2004. The biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate by the heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1671, 34–43.
- Duncan, M.B., Liu, M., Fox, C., Liu, J., 2006. Characterization of the N-deacetylase domain from the heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 1232–1237.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.
- Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.
- Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegué, E., Song, H., VandenBerg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., Bergers, G., 2008. HIF1 α Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion. *Cancer Cell* 13, 206–220.
- Du, W.W., Yang, W., Yee, A.J., 2013. Roles of versican in cancer biology--tumorigenesis, progression and metastasis. *Histol. Histopathol.* 28, 701–713.
- Dwivedi, P.P., Lam, N., Powell, B.C., 2013. Boning up on glypicans--opportunities for new insights into bone biology. *Cell Biochem. Funct.* 31, 91–114.

- Echtermeyer, F., Baciú, P.C., Saoncella, S., Ge, Y., Goetinck, P.F., 1999. Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 20), 3433–3441.
- Eckert, R., Ragg, H., 2003. Zinc ions promote the interaction between heparin and heparin cofactor II. *FEBS Lett.* 541, 121–125.
- Edavettal, S.C., Carrick, K., Shah, R.R., Pedersen, L.C., Tropsha, A., Pope, R.M., Liu, J., 2004a. A conformational change in heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-1 is induced by binding to heparan sulfate. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 4680–4688.
- Edavettal, S.C., Lee, K.A., Negishi, M., Linhardt, R.J., Liu, J., Pedersen, L.C., 2004b. Crystal structure and mutational analysis of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 1. *J. Biol. Chem.* 279, 25789–25797.
- Edwards, J.P., Emens, L.A., 2010. The multikinase inhibitor Sorafenib reverses the suppression of IL-12 and enhancement of IL-10 by PGE2 in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1220–1228.
- Elfenbein, A., Simons, M., 2013. Syndecan-4 signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 3799–3804.
- Embree, M.C., Kilts, T.M., Ono, M., Inkson, C.A., Syed-Picard, F., Karsdal, M.A., Oldberg, A., Bi, Y., Young, M.F., 2010. Biglycan and fibromodulin have essential roles in regulating chondrogenesis and extracellular matrix turnover in temporomandibular joint osteoarthritis. *Am. J. Pathol.* 176, 812–826.
- Emerman, J.T., Jones, N., Fiedler, E.E., 1988. Glycosaminoglycan accumulation by normal and malignant human mammary epithelial cells in primary culture. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 66, 309–318.
- Erickson, A.C., Couchman, J.R., 2000. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 48, 1291–1306.
- Esendagli, G., Bruderek, K., Goldmann, T., Busche, A., Branscheid, D., Vollmer, E., Brandau, S., 2008. Malignant and non-malignant lung tissue areas are differentially populated by natural killer cells and regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* 59, 32–40.
- Esko, J.D., Lindahl, U., 2001. Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.* 108, 169–173.
- Esko, J.D., Selleck, S.B., 2002. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 435–471.
- Esko, J.D., Zhang, L., 1996. Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 663–670.
- Essner, J., Chen, E., Ekker, S., 2006. Syndecan-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 152–156.
- Evers, M.R., Xia, G., Kang, H.G., Schachner, M., Baenziger, J.U., 2001. Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 276, 36344–36353.
- Ezura, Y., Chakravarti, S., Oldberg, A., Chervoneva, I., Birk, D.E., 2000. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J. Cell Biol.* 151, 779–788.
- Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I.S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L.-P., Gimotty, P.A., Gilks, C.B., Lal, P., Zhang, L., Coukos, G., 2011. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 475, 226–230.
- Fainaru, O., Almog, N., Yung, C.W., Nakai, K., Montoya-Zavala, M., Abdollahi, A., D'Amato, R., Ingber, D.E., 2010. Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells. *FASEB J.* 24, 1411–1418.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., Puccetti, P., 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 1206–1212.
- Fanger, N.A., Maliszewski, C.R., Schooley, K., Griffith, T.S., 1999. Human Dendritic Cells Mediate Cellular Apoptosis via Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (Trail). *J. Exp. Med.* 190, 1155–1164.
- Fauriat, C., Just-Landi, S., Mallet, F., Arnoulet, C., Sainty, D., Olive, D., Costello, R.T., 2007. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* 109, 323–330.

- Fears, C.Y., Gladson, C.L., Woods, A., 2006. Syndecan-2 is expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 14533–14536.
- Felix, R., Halasy-Nagy, J., Wetterwald, A., Cecchini, M.G., Fleisch, H., Hofstetter, W., 1996. Synthesis of membrane- and matrix-bound colony-stimulating factor-1 by cultured osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* 166, 311–322.
- Feng, M., Ho, M., 2014. Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer. *FEBS Lett.* 588, 377–382.
- Ferguson, B.W., Datta, S., 2011. Role of heparan sulfate 2-o-sulfotransferase in prostate cancer cell proliferation, invasion, and growth factor signaling. *Prostate Cancer* 2011, 893208.
- Fernández-Vega, I., García, O., Crespo, A., Castañón, S., Menéndez, P., Astudillo, A., Quirós, L.M., 2013. Specific genes involved in synthesis and editing of heparan sulfate proteoglycans show altered expression patterns in breast cancer. *BMC Cancer* 13, 24.
- Ferreras, C., Rushton, G., Cole, C.L., Babur, M., Telfer, B.A., van Kuppevelt, T.H., Gardiner, J.M., Williams, K.J., Jayson, G.C., Avizienyte, E., 2012. Endothelial heparan sulfate 6-O-sulfation levels regulate angiogenic responses of endothelial cells to fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 287, 36132–36146.
- Feyerabend, T.B., Li, J.-P., Lindahl, U., Rodewald, H.-R., 2006. Heparan sulfate C5-epimerase is essential for heparin biosynthesis in mast cells. *Nat. Chem. Biol.* 2, 195–196.
- Fico, A., Maina, F., Dono, R., 2011. Fine-tuning of cell signaling by glypicans. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 923–929.
- Fidler, I.J., 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.
- Fiedler, L.R., Eble, J.A., 2009. Decorin regulates endothelial cell-matrix interactions during angiogenesis. *Cell Adhes. Migr.* 3, 3–6.
- Filmus, J., 2001. Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology* 11, 19R–23R.
- Filmus, J., Capurro, M., 2013. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS J.* 280, 2471–2476.
- Filmus, J., Capurro, M., Rast, J., 2008. Glypicans. *Genome Biol.* 9, 224.
- Font, B., Eichenberger, D., Goldschmidt, D., Boutillon, M.M., Hulmes, D.J., 1998. Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type I collagen fibrillogenesis—critical roles for disulphide bonding and the C-terminal region. *Eur. J. Biochem. FEBS* 254, 580–587.
- Franco, C.R.C., Trindade, E.S., Rocha, H.A.O., da Silveira, R.B., Paludo, K.S., Chammas, R., Veiga, S.S., Nader, H.B., Dietrich, C.P., 2009. Glycosaminoglycan chains from alpha5beta1 integrin are involved in fibronectin-dependent cell migration. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 87, 677–686.
- Fransson, L.-A., Belting, M., Cheng, F., Jönsson, M., Mani, K., Sandgren, S., 2004. Novel aspects of glypican glycobiology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 61, 1016–1024.
- Fremd, C., Schuetz, F., Sohn, C., Beckhove, P., Domschke, C., 2013. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology* 2, e25443.
- Frevert, U., Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B., Nussenzweig, V., 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J. Exp. Med.* 177, 1287–1298.
- Frey, H., Schroeder, N., Manon-Jensen, T., Iozzo, R.V., Schaefer, L., 2013. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J.* 280, 2165–2179.
- Fridlender, Z.G., Albelda, S.M., 2012a. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 33, 949–955.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., Albelda, S.M., 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Cheng, G., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Bayuh, R., Worthen, G.S., Albelda, S.M., 2012b. Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS One* 7, e31524.

- Friese, M.A., Platten, M., Lutz, S.Z., Naumann, U., Aulwurm, S., Bischof, F., Bühring, H.-J., Dichgans, J., Rammensee, H.-G., Steinle, A., Weller, M., 2003. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res.* 63, 8996–9006.
- Frischknecht, R., Seidenbecher, C.I., 2012. Brevican: A key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1051–1054.
- Fukuta, M., Kobayashi, Y., Uchimura, K., Kimata, K., Habuchi, O., 1998a. Molecular cloning and expression of human chondroitin 6-sulfotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1399, 57–61.
- Fukuta, M., Kobayashi, Y., Uchimura, K., Kimata, K., Habuchi, O., 1998b. Molecular cloning and expression of human chondroitin 6-sulfotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1399, 57–61.
- Funderburgh, J.L., 2000. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 10, 951–958.
- Gabrivovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., Carbone, D.P., 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92, 4150–4166.
- Gabrivovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M., Kast, W.M., 2001. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 5398–5406.
- Galdiero, M.R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., Jaillon, S., 2013. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 218, 1402–1410.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964.
- Gandhi, N.S., Mancera, R.L., 2008. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 72, 455–482.
- Gassmann, P., Haier, J., 2008. The tumor cell-host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 171–181.
- Gastl, G.A., Abrams, J.S., Nanus, D.M., Oosterkamp, R., Silver, J., Liu, F., Chen, M., Albino, A.P., Bander, N.H., 1993. Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 55, 96–101.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656–661.
- Gerlitz, O., Basler, K., 2002. Wingful, an extracellular feedback inhibitor of Wingless. *Genes Dev.* 16, 1055–1059.
- Germano, G., Frapolli, R., Belgiovine, C., Anselmo, A., Pesce, S., Liguori, M., Erba, E., Ubaldi, S., Zucchetti, M., Pasqualini, F., Nebuloni, M., van Rooijen, N., Mortarini, R., Beltrame, L., Marchini, S., Fuso Nerini, I., Sanfilippo, R., Casali, P.G., Pilotti, S., Galmarini, C.M., Anichini, A., Mantovani, A., D’Incalci, M., Allavena, P., 2013. Role of Macrophage Targeting in the Antitumor Activity of Trabectedin. *Cancer Cell* 23, 249–262.
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Zarski, J.P., Drouet, E., 2001. [Receptors for hepatitis C virus: update data]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 25, 1011–1015.
- Gertner-Dardenne, J., Bonnafous, C., Bezombes, C., Capietto, A.-H., Scaglione, V., Ingoure, S., Cendron, D., Gross, E., Lepage, J.-F., Quillet-Mary, A., Ysebaert, L., Laurent, G., Sicard, H., Fournié, J.-J., 2009. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood* 113, 4875–4884.
- Gesteira, T.F., Pol-Fachin, L., Coulson-Thomas, V.J., Lima, M.A., Verli, H., Nader, H.B., 2013. Insights into the N-sulfation mechanism: molecular dynamics simulations of the N-sulfotransferase domain of NDST1 and mutants. *PLoS One* 8, e70880.
- Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., Zitvogel, L., 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 202, 919–929.
- Ghiselli, G., Agrawal, A., 2005. The human D-glucuronyl C5-epimerase gene is transcriptionally activated through the beta-catenin-TCF4 pathway. *Biochem. J.* 390, 493–499.
- Ghiselli, G., Iozzo, R.V., 2000. Overexpression of bamacan/SMC3 causes transformation. *J. Biol. Chem.* 275, 20235–20238.

- Gil-Bernabé, A.M., Lucotti, S., Muschel, R.J., 2013. Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? *Br. J. Haematol.* 162, 433–441.
- Giovarelli, M., Musiani, P., Garotta, G., Ebner, R., Di Carlo, E., Kim, Y., Cappello, P., Rigamonti, L., Bernabei, P., Novelli, F., Modesti, A., Coletti, A., Ferrie, A.K., Lollini, P.L., Ruben, S., Salcedo, T., Forni, G., 1999. A “stealth effect”: adenocarcinoma cells engineered to express TRAIL elude tumor-specific and allogeneic T cell reactions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 4886–4893.
- Girardin, E.P., HajMohammadi, S., Birmele, B., Helisch, A., Shworak, N.W., de Agostini, A.I., 2005. Synthesis of Anticoagulant Active Heparan Sulfate Proteoglycans by Glomerular Epithelial Cells Involves Multiple 3-O-Sulfotransferase Isoforms and a Limiting Precursor Pool. *J. Biol. Chem.* 280, 38059–38070.
- Gjertsen, M.K., Bjorheim, J., Saeterdal, I., Myklebust, J., Gaudernack, G., 1997. Cytotoxic CD4+ and CD8+ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 72, 784–790.
- Glinka, Y., Prud’homme, G.J., 2008. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J. Leukoc. Biol.* 84, 302–310.
- Gober, H.-J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., De Libero, G., 2003. Human T cell receptor gamma delta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* 197, 163–168.
- Gocheva, V., Wang, H.-W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T., Joyce, J.A., 2010. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 24, 241–255.
- Gogoi, D., Chiplunkar, S.V., 2013. Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside. *Indian J. Med. Res.* 138, 755–761.
- Gomes, A.Q., Correia, D.V., Silva-Santos, B., 2007. Non-classical major histocompatibility complex proteins as determinants of tumour immunosurveillance. *EMBO Rep.* 8, 1024–1030.
- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., Noelle, R.J., 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 1783–1786.
- González-Iglesias, R., Pajares, M.A., Ocal, C., Espinosa, J.C., Oesch, B., Gasset, M., 2002. Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. *J. Mol. Biol.* 319, 527–540.
- Goodison, S., Urquidi, V., Tarin, D., 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol. MP* 52, 189–196.
- Goossens, D., Van Gestel, S., Claes, S., De Rijk, P., Souery, D., Massat, I., Van den Bossche, D., Backhovens, H., Mendlewicz, J., Van Broeckhoven, C., Del-Favero, J., 2003. A novel CpG-associated brain-expressed candidate gene for chromosome 18q-linked bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* 8, 83–89.
- Gorden, D.L., Fingleton, B., Crawford, H.C., Jansen, D.E., Lepage, M., Matrisian, L.M., 2007. Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 121, 495–500.
- Gordon, S., 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23–35.
- Gordon, S., Martinez, F.O., 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593–604.
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., Condeelis, J.S., 2005. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* 65, 5278–5283.
- Götte, M., 2003. Syndecans in inflammation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 575–591.
- Götte, M., Bernfield, M., Jousen, A.M., 2005. Increased leukocyte-endothelial interactions in syndecan-1-deficient mice involve heparan sulfate-dependent and -independent steps. *Curr. Eye Res.* 30, 417–422.
- Granot, Z., Henke, E., Comen, E.A., King, T.A., Norton, L., Benezra, R., 2011. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell* 20, 300–314.
- Gregory, A.D., Houghton, A.M., 2011. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 71, 2411–2416.

- Grigorieva, E., Eshchenko, T., Rykova, V.I., Chernakov, A., Zabarovsky, E., Sidorov, S.V., 2007. Decreased expression of human D-glucuronyl C5-epimerase in breast cancer. *Int. J. Cancer* 122, 1172–1176.
- Grigorieva, E.V., Prudnikova, T.Y., Domanitskaya, N.V., Mostovich, L.A., Pavlova, T.V., Kashuba, V.I., Zabarovsky, E.R., 2011. D-glucuronyl C5-epimerase suppresses small-cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumour growth in vivo. *Br. J. Cancer* 105, 74–82.
- Grobe, K., Esko, J.D., 2002a. Regulated translation of heparan sulfate N-acetylglucosamine N-deacetylase/n-sulfotransferase isozymes by structured 5'-untranslated regions and internal ribosome entry sites. *J. Biol. Chem.* 277, 30699–30706.
- Grobe, K., Ledin, J., Ringvall, M., Holmborn, K., Forsberg, E., Esko, J.D., Kjellén, L., 2002b. Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 209–215.
- Guerrini, M., Agulles, T., Bisio, A., Hricovini, M., Lay, L., Naggi, A., Poletti, L., Sturiale, L., Torri, G., Casu, B., 2002. Minimal heparin/heparan sulfate sequences for binding to fibroblast growth factor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 222–230.
- Guerrini, M., Hricovini, M., Torri, G., 2007. Interaction of heparins with fibroblast growth factors: conformational aspects. *Curr. Pharm. Des.* 13, 2045–2056.
- Guidetti, G.F., Bartolini, B., Bernardi, B., Tira, M.E., Berndt, M.C., Balduini, C., Torti, M., 2004. Binding of von Willebrand factor to the small proteoglycan decorin. *FEBS Lett.* 574, 95–100.
- Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J.-C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., 2005a. Modifications of the glycosaminoglycan-linkage region of proteoglycans: phosphorylation and sulfation determine the activity of the human beta1,4-galactosyltransferase 7 and beta1,3-glucuronosyltransferase I. *ScientificWorldJournal* 5, 510–514.
- Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J.-C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., 2005b. Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 280, 1417–1425.
- Gu, X., Ma, Y., Xiao, J., Zheng, H., Song, C., Gong, Y., Xing, X., 2012. Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers. *Clin. Exp. Med.* 12, 195–199.
- Habuchi, H., Habuchi, O., Kimata, K., 1995. Purification and characterization of heparan sulfate 6-sulfotransferase from the culture medium of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 270, 4172–4179.
- Habuchi, H., Kimata, K., 2010. Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 93, 79–111.
- Habuchi, H., Miyake, G., Nogami, K., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Kusche-Gullberg, M., Habuchi, O., Tanaka, M., Kimata, K., 2003. Biosynthesis of heparan sulphate with diverse structures and functions: two alternatively spliced forms of human heparan sulphate 6-O-sulphotransferase-2 having different expression patterns and properties. *Biochem. J.* 371, 131–142.
- Habuchi, H., Nagai, N., Sugaya, N., Atsumi, F., Stevens, R.L., Kimata, K., 2007. Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation, and late embryonic lethality. *J. Biol. Chem.* 282, 15578–15588.
- Habuchi, H., Tanaka, M., Habuchi, O., Yoshida, K., Suzuki, H., Ban, K., Kimata, K., 2000. The occurrence of three isoforms of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase having different specificities for hexuronic acid adjacent to the targeted N-sulfoglucosamine. *J. Biol. Chem.* 275, 2859–2868.
- Habuchi, O., 2000. Diversity and functions of glycosaminoglycan sulfotransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1474, 115–127.
- Habuchi, O., Moroi, R., Ohtake, S., 2002. Enzymatic synthesis of chondroitin sulfate E by N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase purified from squid cartilage. *Anal. Biochem.* 310, 129–136.
- Häcker, U., Lin, X., Perrimon, N., 1997. The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Dev. Camb. Engl.* 124, 3565–3573.

- Hagner-McWhirter, A., Li, J.-P., Oscarson, S., Lindahl, U., 2004. Irreversible glucuronyl C5-epimerization in the biosynthesis of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 279, 14631–14638.
- Hagner-McWhirter, A., Lindahl, U., Li, J. p, 2000. Biosynthesis of heparin/heparan sulphate: mechanism of epimerization of glucuronyl C-5. *Biochem. J.* 347 Pt 1, 69–75.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schröter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., Tschopp, J., 1996. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363–1366.
- HajMohammadi, S., Enjoji, K., Princivalle, M., Christi, P., Lech, M., Beeler, D., Rayburn, H., Schwartz, J.J., Barzegar, S., de Agostini, A.I., Post, M.J., Rosenberg, R.D., Shworak, N.W., 2003. Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis. *J. Clin. Invest.* 111, 989–999.
- Hamel, D.J., Sielaff, I., Proudfoot, A.E.I., Handel, T.M., 2009. Chapter 4. Interactions of chemokines with glycosaminoglycans. *Methods Enzymol.* 461, 71–102.
- Hammond, E., Khurana, A., Shridhar, V., Dredge, K., 2014. The Role of Heparanase and Sulfatases in the Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans within the Tumor Microenvironment and Opportunities for Novel Cancer Therapeutics. *Front. Oncol.* 4, 195.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Handley, C.J., Samiric, T., Ilic, M.Z., 2006. Structure, metabolism, and tissue roles of chondroitin sulfate proteoglycans. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 53, 219–232.
- Harrington, L.E., Mangan, P.R., Weaver, C.T., 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 349–356.
- Hassell, J.R., Birk, D.E., 2010. The molecular basis of corneal transparency. *Exp. Eye Res.* 91, 326–335.
- Hassell, J., Yamada, Y., Arikawa-Hirasawa, E., 2002. Role of perlecan in skeletal development and diseases. *Glycoconj. J.* 19, 263–267.
- Hatabe, S., Kimura, H., Arao, T., Kato, H., Hayashi, H., Nagai, T., Matsumoto, K., DE Velasco, M., Fujita, Y., Yamanouchi, G., Fukushima, M., Yamada, Y., Ito, A., Okuno, K., Nishio, K., 2013. Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-2 in colorectal cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 1, 845–850.
- Häuselmann, I., Borsig, L., 2014. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front. Oncol.* 4, 28.
- Hayday, A.C., 2000. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 975–1026.
- Hecht, M.-L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., De Paz, J.L., Noti, C., Schauer, S., Porgador, A., Seeberger, P.H., 2009. Natural Cytotoxicity Receptors NKp30, NKp44 and NKp46 Bind to Different Heparan Sulfate/Heparin Sequences. *J. Proteome Res.* 8, 712–720.
- Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., Jain, R.K., 1997. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.* 3, 177–182.
- Hempel, N., How, T., Cooper, S.J., Green, T.R., Dong, M., Copland, J.A., Wood, C.G., Globe, G.C., 2008. Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta. *Carcinogenesis* 29, 905–912.
- Higai, K., Suzuki, C., Imaizumi, Y., Xin, X., Azuma, Y., Matsumoto, K., 2011. Binding affinities of NKG2D and CD94 to sialyl Lewis X-expressing N-glycans and heparin. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 8–12.
- Hikino, M., Mikami, T., Faissner, A., Vilela-Silva, A.-C.E.S., Pavão, M.S.G., Sugahara, K., 2003. Oversulfated dermatan sulfate exhibits neurite outgrowth-promoting activity toward embryonic mouse hippocampal neurons: implications of dermatan sulfate in neuritogenesis in the brain. *J. Biol. Chem.* 278, 43744–43754.
- Hileman, R.E., Fromm, J.R., Weiler, J.M., Linhardt, R.J., 1998. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 20, 156–167.
- Hileman, R.E., Jennings, R.N., Linhardt, R.J., 1998. Thermodynamic analysis of the heparin interaction with a basic cyclic peptide using isothermal titration calorimetry. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 15231–15237.

- Hiraoka, N., Nakagawa, H., Ong, E., Akama, T.O., Fukuda, M.N., Fukuda, M., 2000. Molecular cloning and expression of two distinct human chondroitin 4-O-sulfotransferases that belong to the HNK-1 sulfotransferase gene family. *J. Biol. Chem.* 275, 20188–20196.
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., Maru, Y., 2006. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1369–1375.
- Hirose, M., Matsumura, R., Sato, K., Murai, T., Kawashima, H., 2011. Binding of L-selectin to its vascular and extravascular ligands is differentially regulated by pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 437–442.
- Holmborn, K., Ledin, J., Smeds, E., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., Kjellén, L., 2004. Heparan sulfate synthesized by mouse embryonic stem cells deficient in NDST1 and NDST2 is 6-O-sulfated but contains no N-sulfate groups. *J. Biol. Chem.* 279, 42355–42358.
- Ho, M., Kim, H., 2011. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 47, 333–338.
- Houghton, A.M., Rzymkiewicz, D.M., Ji, H., Gregory, A.D., Egea, E.E., Metz, H.E., Stolz, D.B., Land, S.R., Marconcini, L.A., Kliment, C.R., Jenkins, K.M., Beaulieu, K.A., Mouded, M., Frank, S.J., Wong, K.K., Shapiro, S.D., 2010. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat. Med.* 16, 219–223.
- Hricováni, M., Guerrini, M., Bisio, A., Torri, G., Naggi, A., Casu, B., 2002. Active conformations of glycosaminoglycans. NMR determination of the conformation of heparin sequences complexed with antithrombin and fibroblast growth factors in solution. *Semin. Thromb. Hemost.* 28, 325–334.
- Huang, B., Pan, P.-Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., Chen, S.-H., 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 66, 1123–1131.
- Huh, S.J., Liang, S., Sharma, A., Dong, C., Robertson, G.P., 2010. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer Res.* 70, 6071–6082.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., Levitsky, H., 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* 188, 2357–2368.
- Ibrahim, S.A., Hassan, H., Götte, M., 2014. microRNA regulation of proteoglycan function in cancer. *FEBS J.* n/a–n/a.
- Iida, J., Wilhelmson, K.L., Ng, J., Lee, P., Morrison, C., Tam, E., Overall, C.M., McCarthy, J.B., 2007. Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A). *Biochem. J.* 403, 553–563.
- Imai, Y., Ibaraki, K., Odajima, R., Shishiba, Y., 1994. Analysis of proteoglycan synthesis by retroocular tissue fibroblasts under the influence of interleukin 1 beta and transforming growth factor-beta. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 131, 630–638.
- Imberty, A., Lortat-Jacob, H., Pérez, S., 2007. Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr. Res.* 342, 430–439.
- Inatani, M., Tanihara, H., Oohira, A., Otori, Y., Nishida, A., Honjo, M., Kido, N., Honda, Y., 2000. Neuroglycan C, a neural tissue-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, in retinal neural network formation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 4338–4346.
- Iozzo, R.V., 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 609–652.
- Iozzo, R.V., 2005. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 646–656.
- Iozzo, R.V., San Antonio, J.D., 2001. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J. Clin. Invest.* 108, 349–355.
- Isacke, C.M., Yarwood, H., 2002. The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 718–721.
- Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., Aikou, T., 2000. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88, 577–583.
- Ishii, M., Maeda, N., 2008. Oversulfated chondroitin sulfate plays critical roles in the neuronal migration in the cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 283, 32610–32620.

- Izumikawa, T., Koike, T., Kitagawa, H., 2012. Chondroitin 4-O-sulfotransferase-2 regulates the number of chondroitin sulfate chains initiated by chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *Biochem. J.* 441, 697–705.
- Izumikawa, T., Koike, T., Shiozawa, S., Sugahara, K., Tamura, J., Kitagawa, H., 2008. Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization: chondroitin polymerization is achieved by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members. *J. Biol. Chem.* 283, 11396–11406.
- Izumikawa, T., Okuura, Y., Koike, T., Sakoda, N., Kitagawa, H., 2011. Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates the chain length of chondroitin sulfate in co-operation with chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *Biochem. J.* 434, 321–331.
- Izvolosky, K.I., Lu, J., Martin, G., Albrecht, K.H., Cardoso, W.V., 2008. Systemic inactivation of Hs6st1 in mice is associated with late postnatal mortality without major defects in organogenesis. *Genes. N. Y. N 2000* 46, 8–18.
- Janik, M.E., Lityńska, A., Vereecken, P., 2010. Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 545–555.
- Jarkowski, A., Khushalani, N.I., 2014. BRAF and beyond: Tailoring strategies for the individual melanoma patient. *J. Carcinog.* 13, 1.
- Jemth, P., Smeds, E., Do, A.-T., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., 2003. Oligosaccharide library-based assessment of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 278, 24371–24376.
- Jensen, H.K., Donskov, F., Marcussen, N., Nordmark, M., Lundbeck, F., von der Maase, H., 2009a. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4709–4717.
- Jensen, H.K., Donskov, F., Nordmark, M., Marcussen, N., von der Maase, H., 2009b. Increased intratumoral FOXP3-positive regulatory immune cells during interleukin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 1052–1058.
- Jepsen, K.J., Wu, F., Peragallo, J.H., Paul, J., Roberts, L., Ezura, Y., Oldberg, A., Birk, D.E., Chakravarti, S., 2002. A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 277, 35532–35540.
- Jiang, H., Harris, M.B., Rothman, P., 2000. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 1063–1070.
- Johansson, M., Denardo, D.G., Coussens, L.M., 2008. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol. Rev.* 222, 145–154.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., Enk, A.H., 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193, 1285–1294.
- Julien, S., Ivetic, A., Grigoriadis, A., QiZe, D., Burford, B., Sproviero, D., Picco, G., Gillett, C., Papp, S.L., Schaffer, L., Tutt, A., Taylor-Papadimitriou, J., Pinder, S.E., Burchell, J.M., 2011. Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res.* 71, 7683–7693.
- Jury, E.C., Kabouridis, P.S., 2010. New role for Agrin in T cells and its potential importance in immune system regulation. *Arthritis Res. Ther.* 12, 205.
- Kabelitz, D., Wesch, D., 2003. Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit. Rev. Immunol.* 23, 339–370.
- Kageshita, T., Kawakami, Y., Ono, T., 2001. Clinical significance of MART-1 and HLA-A2 expression and CD8+ T cell infiltration in melanocytic lesions in HLA-A2 phenotype patients. *J. Dermatol. Sci.* 25, 36–44.
- Kaifu, T., Escalière, B., Gastinel, L.N., Vivier, E., Baratin, M., 2011. B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3531–3539.
- Kakuta, Y., Li, L., Pedersen, L.C., Pedersen, L.G., Negishi, M., 2003. Heparan sulphate N-sulphotransferase activity: reaction mechanism and substrate recognition. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 331–334.
- Kakuta, Y., Pedersen, L.G., Pedersen, L.C., Negishi, M., 1998. Conserved structural motifs in the sulfotransferase family. *Trends Biochem. Sci.* 23, 129–130.

- Kalamajski, S., Oldberg, A., 2010. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 29, 248–253.
- Kalathas, D., Theocharis, D.A., Bounias, D., Kyriakopoulou, D., Papageorgakopoulou, N., Stavropoulos, M.S., Vynios, D.H., 2009. Alterations of glycosaminoglycan disaccharide content and composition in colorectal cancer: structural and expressional studies. *Oncol. Rep.* 22, 369–375.
- Kalathas, D., Triantaphyllidou, I.-E., Mastronikolis, N.S., Goumas, P.D., Papadas, T.A., Tsiropoulos, G., Vynios, D.H., 2010. The chondroitin/dermatan sulfate synthesizing and modifying enzymes in laryngeal cancer: expressional and epigenetic studies. *Head Neck Oncol.* 2, 27.
- Kang, H.-G., Evers, M.R., Xia, G., Baenziger, J.U., Schachner, M., 2002. Molecular cloning and characterization of chondroitin-4-O-sulfotransferase-3. A novel member of the HNK-1 family of sulfotransferases. *J. Biol. Chem.* 277, 34766–34772.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., Schreiber, R.D., 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7556–7561.
- Kaplan, R.N., Psaila, B., Lyden, D., 2006. Bone marrow cells in the “pre-metastatic niche”: within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 521–529.
- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R., 2005. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. 1986. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 6566–6569.
- Karumanchi, S.A., Jha, V., Ramchandran, R., Karihaloo, A., Tsiokas, L., Chan, B., Dhanabal, M., Hanai, J.I., Venkataraman, G., Shriver, Z., Keiser, N., Kalluri, R., Zeng, H., Mukhopadhyay, D., Chen, R.L., Lander, A.D., Hagihara, K., Yamaguchi, Y., Sasisekharan, R., Cantley, L., Sukhatme, V.P., 2001. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol. Cell* 7, 811–822.
- Katsumi, M., 1974. Acidic glycosaminoglycans in human platelets and leukocytes: The isolation and enzymatic characterization of chondroitin 4-sulfate. *Clin. Chim. Acta* 57, 115–124.
- Kawashima, H., Atarashi, K., Hirose, M., Hirose, J., Yamada, S., Sugahara, K., Miyasaka, M., 2002. Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcAbeta1/IdoAalpha1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. *J. Biol. Chem.* 277, 12921–12930.
- Kawashima, H., Hirose, M., Hirose, J., Nagakubo, D., Plaas, A.H., Miyasaka, M., 2000. Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. *J. Biol. Chem.* 275, 35448–35456.
- Khaled, Y.S., Ammori, B.J., Elkord, E., 2013. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. *Immunol. Cell Biol.* 91, 493–502.
- Khong, H.T., Restifo, N.P., 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.* 3, 999–1005.
- Khurana, A., Liu, P., Mellone, P., Lorenzon, L., Vincenzi, B., Datta, K., Yang, B., Linhardt, R.J., Lingle, W., Chien, J., Baldi, A., Shridhar, V., 2011. HSulf-1 modulates FGF2- and hypoxia-mediated migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res.* 71, 2152–2161.
- Kim, B.T., Kitagawa, H., Tamura, J., Saito, T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., Sugahara, K., 2001. Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7176–7181.
- Kim, J., Modlin, R.L., Moy, R.L., Dubinett, S.M., McHugh, T., Nickoloff, B.J., Uyemura, K., 1995. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 2240–2247.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H.L., Weissman, I.L., Yokoyama, W.M., 2000. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2731–2736.
- Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.-W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.-L., Karin, M., 2009. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457, 102–106.
- Kinugasa, Y., Ishiguro, H., Tokita, Y., Oohira, A., Ohmoto, H., Higashiyama, S., 2004. Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 1045–1049.
- Kirkpatrick, C.A., Selleck, S.B., 2007. Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 1829–1832.

- Kitagawa, H., Fujita, M., Ito, N., Sugahara, K., 2000. Molecular cloning and expression of a novel chondroitin 6-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 275, 21075–21080.
- Kitagawa, H., Shimakawa, H., Sugahara, K., 1999. The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 274, 13933–13937.
- Kitagawa, H., Tanaka, Y., Tsuchida, K., Goto, F., Ogawa, T., Lidholt, K., Lindahl, U., Sugahara, K., 1995. N-acetylgalactosamine (GalNAc) transfer to the common carbohydrate-protein linkage region of sulfated glycosaminoglycans. Identification of UDP-GalNAc:chondro-oligosaccharide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase in fetal bovine serum. *J. Biol. Chem.* 270, 22190–22195.
- Kjellén, L., 2003. Glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferases in heparan sulphate biosynthesis and biology. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 340–342.
- Klein, N.J., Shennan, G.I., Heyderman, R.S., Levin, M., 1992. Alteration in glycosaminoglycan metabolism and surface charge on human umbilical vein endothelial cells induced by cytokines, endotoxin and neutrophils. *J. Cell Sci.* 102 (Pt 4), 821–832.
- Klüppel, M., Wight, T.N., Chan, C., Hinek, A., Wrana, J.L., 2005. Maintenance of chondroitin sulfation balance by chondroitin-4-sulfotransferase 1 is required for chondrocyte development and growth factor signaling during cartilage morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 132, 3989–4003.
- Knudson, C.B., Knudson, W., 2001. Cartilage proteoglycans. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 69–78.
- Kobayashi, H., 2006. Endogenous anti-inflammatory substances, inter-alpha-inhibitor and bikunin. *Biol. Chem.* 387, 1545–1549.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M., Kimata, K., 1996. Purification and characterization of heparan sulfate 2-sulfotransferase from cultured Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 271, 7645–7653.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Yoneda, M., Habuchi, O., Kimata, K., 1997. Molecular cloning and expression of Chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 272, 13980–13985.
- Kobayashi, M., Sugumaran, G., Liu, J., Shworak, N.W., Silbert, J.E., Rosenberg, R.D., 1999. Molecular cloning and characterization of a human uronyl 2-sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* 274, 10474–10480.
- Kobayashi, S., Akiyama, T., Nata, K., Abe, M., Tajima, M., Shervani, N.J., Unno, M., Matsuno, S., Sasaki, H., Takasawa, S., Okamoto, H., 2000a. Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor. *J. Biol. Chem.* 275, 10723–10726.
- Kobayashi, S., Morimoto, K., Shimizu, T., Takahashi, M., Kurosawa, H., Shirasawa, T., 2000b. Association of EXT1 and EXT2, hereditary multiple exostoses gene products, in Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 860–867.
- Kobayashi, T., Yan, H., Kurahashi, Y., Ito, Y., Maeda, H., Tada, T., Hongo, K., Nakayama, J., 2013. Role of GalNAc4S-6ST in astrocytic tumor progression. *PLoS One* 8, e54278.
- Koh, C.Y., Blazar, B.R., George, T., Welniak, L.A., Capitini, C.M., Raziuddin, A., Murphy, W.J., Bennett, M., 2001. Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. *Blood* 97, 3132–3137.
- Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J.-I., Kitagawa, H., 2009. FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region. *Biochem. J.* 421, 157–162.
- Kolaczowska, E., Kubes, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175.
- Kolset, S.O., Kjellén, L., Seljelid, R., Lindahl, U., 1983. Changes in glycosaminoglycan biosynthesis during differentiation in vitro of human monocytes. *Biochem. J.* 210, 661–667.
- Kolset, S.O., Pejler, G., 2011. Serglycin: a structural and functional chameleon with wide impact on immune cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 4927–4933.
- Kono, H., Rock, K.L., 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 279–289.
- Korpetinou, A., Skandalis, S.S., Labropoulou, V.T., Smirlaki, G., Noulas, A., Karamanos, N.K., Theocharis, A.D., 2014. Serglycin: At the Crossroad of Inflammation and Malignancy. *Front. Oncol.* 3.

- Koyama, T., Parkinson, J.F., Sié, P., Bang, N.U., Müller-Berghaus, G., Preissner, K.T., 1991. Different glycoforms of human thrombomodulin. Their glycosaminoglycan-dependent modulatory effects on thrombin inactivation by heparin cofactor II and antithrombin III. *Eur. J. Biochem. FEBS* 198, 563–570.
- Kraich, M., Klein, M., Patiño, E., Harrer, H., Nickel, J., Sebald, W., Mueller, T.D., 2006. A modular interface of IL-4 allows for scalable affinity without affecting specificity for the IL-4 receptor. *BMC Biol.* 4, 13.
- Krenn, E.C., Wille, I., Gesslbauer, B., Poteser, M., van Kuppevelt, T.H., Kungl, A.J., 2008. Glycanogenomics: A qPCR-approach to investigate biological glycan function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 297–302.
- Kronenberg, M., 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 877–900.
- Kruse, N., Shen, B.J., Arnold, S., Tony, H.P., Müller, T., Sebald, W., 1993. Two distinct functional sites of human interleukin 4 are identified by variants impaired in either receptor binding or receptor activation. *EMBO J.* 12, 5121–5129.
- Kryczek, I., 2006. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J. Exp. Med.* 203, 871–881.
- Kurosawa, N., Chen, G.Y., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Sakuma, S., Muramatsu, T., 2001. Glypican-2 binds to midkine: the role of glypican-2 in neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *Glycoconj. J.* 18, 499–507.
- Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Pikas, D.S., Kjellén, L., 1998. Identification and expression in mouse of two heparan sulfate glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase genes. *J. Biol. Chem.* 273, 11902–11907.
- Kusche-Gullberg, M., Kjellén, L., 2003. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 605–611.
- Labelle, M., Hynes, R.O., 2012. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov.* 2, 1091–1099.
- Lai, D., Wang, F., Chen, Y., Wang, C., Liu, S., Lu, B., Ge, X., Guo, L., 2012. Human ovarian cancer stem-like cells can be efficiently killed by $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 61, 979–989.
- Lai, J., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Greene, E.L., Matthews, T.A., Smith, D.I., Kaufmann, S.H., Roberts, L.R., Shridhar, V., 2003. Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer. *J. Biol. Chem.* 278, 23107–23117.
- Lai, J.-P., Sandhu, D.S., Yu, C., Moser, C.D., Hu, C., Shire, A.M., Aderca, I., Murphy, L.M., Adjei, A.A., Sanderson, S., Roberts, L.R., 2010. Sulfatase 2 protects hepatocellular carcinoma cells against apoptosis induced by the PI3K inhibitor LY294002 and ERK and JNK kinase inhibitors. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 30, 1522–1528.
- Lai, J.-P., Thompson, J.R., Sandhu, D.S., Roberts, L.R., 2008. Heparin-degrading sulfatases in hepatocellular carcinoma: roles in pathogenesis and therapy targets. *Future Oncol. Lond. Engl.* 4, 803–814.
- Lakshmi Narendra, B., Eshvendar Reddy, K., Shantikumar, S., Ramakrishna, S., 2013. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* 62, 823–834.
- Lamanna, W.C., Baldwin, R.J., Padva, M., Kalus, I., Ten Dam, G., van Kuppevelt, T.H., Gallagher, J.T., von Figura, K., Dierks, T., Merry, C.L.R., 2006. Heparan sulfate 6-O-endosulfatases: discrete in vivo activities and functional co-operativity. *Biochem. J.* 400, 63–73.
- Lang, R., Patel, D., Morris, J.J., Rutschman, R.L., Murray, P.J., 2002. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 2253–2263.
- Lanier, L.L., 2005. NK CELL RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225–274.
- Lardner, A., 2001. The effects of extracellular pH on immune function. *J. Leukoc. Biol.* 69, 522–530.
- Läubli, H., Borsig, L., 2010. Selectins promote tumor metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 20, 169–177.
- Lauder, R.M., 2009. Chondroitin sulphate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. *Complement. Ther. Med.* 17, 56–62.
- Laurent, T.C., Laurent, U.B., Fraser, J.R.E., 1996. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol. Cell Biol.* 74, A1–A7.

- Lawrence, R., Yabe, T., Hajmohammadi, S., Rhodes, J., McNeely, M., Liu, J., Lamperti, E.D., Toselli, P.A., Lech, M., Spear, P.G., Rosenberg, R.D., Shworak, N.W., 2007. The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 26, 442–455.
- Ledin, J., Ringvall, M., Thuveson, M., Eriksson, I., Wilén, M., Kusche-Gullberg, M., Forsberg, E., Kjellén, L., 2006. Enzymatically active N-deacetylase/N-sulfotransferase-2 is present in liver but does not contribute to heparan sulfate N-sulfation. *J. Biol. Chem.* 281, 35727–35734.
- Ledin, J., Staatz, W., Li, J.-P., Götte, M., Selleck, S., Kjellén, L., Spillmann, D., 2004. Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J. Biol. Chem.* 279, 42732–42741.
- Lee, T.-H., Seng, S., Sekine, M., Hinton, C., Fu, Y., Avraham, H.K., Avraham, S., 2007. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med.* 4, e186.
- Lemjabbar-Alaoui, H., van Zante, A., Singer, M.S., Xue, Q., Wang, Y.-Q., Tsay, D., He, B., Jablons, D.M., Rosen, S.D., 2010. Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis. *Oncogene* 29, 635–646.
- Lewis, C.E., Pollard, J.W., 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605–612.
- Lewis, J.S., Landers, R.J., Underwood, J.C.E., Harris, A.L., Lewis, C.E., 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J. Pathol.* 192, 150–158.
- Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., Vale, W., 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404, 411–414.
- Li, D., Clark, C.C., Myers, J.C., 2000. Basement membrane zone type XV collagen is a disulfide-bonded chondroitin sulfate proteoglycan in human tissues and cultured cells. *J. Biol. Chem.* 275, 22339–22347.
- Lidholt, K., Fjelstad, M., Lindahl, U., Goto, F., Ogawa, T., Kitagawa, H., Sugahara, K., 1997. Assessment of glycosaminoglycan-protein linkage tetrasaccharides as acceptors for GalNAc- and GlcNAc-transferases from mouse mastocytoma. *Glycoconj. J.* 14, 737–742.
- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., Cao, X., 2009. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 240–249.
- Li, J.P., Gong, F., El Darwish, K., Jalkanen, M., Lindahl, U., 2001. Characterization of the D-glucuronyl C5-epimerase involved in the biosynthesis of heparin and heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 276, 20069–20077.
- Li, J.-P., Gong, F., Hagner-McWhirter, A., Forsberg, E., Abrink, M., Kisilevsky, R., Zhang, X., Lindahl, U., 2003. Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. *J. Biol. Chem.* 278, 28363–28366.
- Li, J., Rancour, D.M., Allende, M.L., Worth, C.A., Darling, D.S., Gilbert, J.B., Menon, A.K., Young, W.W., 2001. The DXD motif is required for GM2 synthase activity but is not critical for nucleotide binding. *Glycobiology* 11, 217–229.
- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., Kjellén, L., 1998. Regulated diversity of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 273, 24979–24982.
- Lindahl, U., Li, J., 2009. Interactions between heparan sulfate and proteins—design and functional implications. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 276, 105–159.
- Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U., Lidholt, K., 1998. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 273, 26265–26268.
- Lin, E.Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A.V., Pollard, J.W., 2002. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 147–162.
- Lin, E.Y., Li, J., Bricard, G., Wang, W., Deng, Y., Sellers, R., Porcelli, S.A., Pollard, J.W., 2007a. Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. *Mol. Oncol.* 1, 288–302.

- Lin, E.Y., Pollard, J.W., 2007b. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res.* 67, 5064–5066.
- Lin, X., 2004. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Dev. Camb. Engl.* 131, 6009–6021.
- Lin, X., Perrimon, N., 1999. Dally cooperates with Drosophila Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature* 400, 281–284.
- Little, P.J., Tannock, L., Olin, K.L., Chait, A., Wight, T.N., 2002. Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor-beta1 exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 55–60.
- Liu, C., Sheng, J., Krahn, J.M., Perera, L., Xu, Y., Hsieh, P.-H., Dou, W., Liu, J., Pedersen, L.C., 2014. Molecular mechanism of substrate specificity for heparan sulfate 2-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 289, 13407–13418.
- Liu, C.-Y., Birk, D.E., Hassell, J.R., Kane, B., Kao, W.W.-Y., 2003. Keratocan-deficient mice display alterations in corneal structure. *J. Biol. Chem.* 278, 21672–21677.
- Liu, K., Vitorica, G.D., Schwickert, T.A., Guermontprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., Nussenzweig, M., 2009. In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. *Science*.
- Li, X.-J., Qian, C.-N., 2011. Serglycin in human cancers. *Chin. J. Cancer* 30, 585–589.
- Li, Y., Miao, L., Cai, H., Ding, J., Xiao, Y., Yang, J., Zhang, D., 2013. The overexpression of glypican-5 promotes cancer cell migration and is associated with shorter overall survival in non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* 6, 1565–1572.
- Lopes, C.C., Toma, L., Pinhal, M. a. S., Porcionatto, M.A., Sogayar, M.C., Dietrich, C.P., Nader, H.B., 2006. EJ-ras oncogene transfection of endothelial cells upregulates the expression of syndecan-4 and downregulates heparan sulfate sulfotransferases and epimerase. *Biochimie* 88, 1493–1504.
- Lortat-Jacob, H., Garrone, P., Banchereau, J., Grimaud, J.A., 1997. Human interleukin 4 is a glycosaminoglycan-binding protein. *Cytokine* 9, 101–105.
- Lortat-Jacob, H., Turnbull, J.E., Grimaud, J.A., 1995. Molecular organization of the interferon gamma-binding domain in heparan sulphate. *Biochem. J.* 310 (Pt 2), 497–505.
- Losa, G.A., Alini, M., 1993. Sulfated proteoglycans in the extracellular matrix of human breast tissues with infiltrating carcinoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 54, 552–557.
- Luan, Q., Sun, J., Li, C., Zhang, G., Lv, Y., Wang, G., Li, C., Ma, C., Gao, T., 2011. Mutual enhancement between heparanase and vascular endothelial growth factor: a novel mechanism for melanoma progression. *Cancer Lett.* 308, 100–111.
- Lum, D.H., Tan, J., Rosen, S.D., Werb, Z., 2007. Gene trap disruption of the mouse heparan sulfate 6-O-endosulfatase gene, Sulf2. *Mol. Cell. Biol.* 27, 678–688.
- Luzina, I.G., Keegan, A.D., Heller, N.M., Rook, G.A.W., Shea-Donohue, T., Atamas, S.P., 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *J. Leukoc. Biol.* 92, 753–764.
- Lyon, M., Rushton, G., Gallagher, J.T., 1997. The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J. Biol. Chem.* 272, 18000–18006.
- MacArthur, J.M., Bishop, J.R., Stanford, K.I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J.L., Esko, J.D., 2007. Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J. Clin. Invest.* 117, 153–164.
- Maccarana, M., Kalamajski, S., Kongsgaard, M., Magnusson, S.P., Oldberg, A., Malmström, A., 2009. Dermatan sulfate epimerase 1-deficient mice have reduced content and changed distribution of iduronic acids in dermatan sulfate and an altered collagen structure in skin. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5517–5528.
- Maccarana, M., Sakura, Y., Tawada, A., Yoshida, K., Lindahl, U., 1996. Domain structure of heparan sulfates from bovine organs. *J. Biol. Chem.* 271, 17804–17810.
- Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Noda, M., 1999. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J. Biol. Chem.* 274, 12474–12479.

- Mahapatra, S., Klee, E.W., Young, C.Y.F., Sun, Z., Jimenez, R.E., Klee, G.G., Tindall, D.J., Donkena, K.V., 2012. Global Methylation Profiling for Risk Prediction of Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 18, 2882–2895.
- Mahley, R.W., Ji, Z.S., 1999. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* 40, 1–16.
- Maimone, M.M., Tollefsen, D.M., 1990. Structure of a dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity. *J. Biol. Chem.* 265, 18263–18271.
- Mak, T.W., Ferrick, D.A., 1998. The gammadelta T-cell bridge: linking innate and acquired immunity. *Nat. Med.* 4, 764–765.
- Malavaki, C., Mizumoto, S., Karamanos, N., Sugahara, K., 2008. Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease. *Connect. Tissue Res.* 49, 133–139.
- Malmström, A., Bartolini, B., Thelin, M.A., Pacheco, B., Maccarana, M., 2012. Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate: biosynthesis and biological function. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 60, 916–925.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sozzani, S., Vecchi, A., Locati, M., Sica, A., 2004. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin. Cancer Biol.* 14, 155–160.
- Marais, R., Marshall, C.J., 1996. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv.* 27, 101–125.
- Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 6, 13.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A., 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 7303–7311.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 453–461.
- Martin, T.A., Harrison, G., Mansel, R.E., Jiang, W.G., 2003. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 46, 165–186.
- Maruyama, K., Selmani, Z., Ishii, H., Yamaguchi, K., 2011. Innate immunity and cancer therapy. *Int. Immunopharmacol.* 11, 350–357.
- Mascotti, D.P., Lohman, T.M., 1995. Thermodynamics of charged oligopeptide-heparin interactions. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 2908–2915.
- Mason, S.D., Joyce, J.A., 2011. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* 21, 228–237.
- Masten, B.J., Olson, G.K., Tarleton, C.A., Rund, C., Schuyler, M., Mehran, R., Archibeque, T., Lipscomb, M.F., 2006. Characterization of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells in Human Lung. *J. Immunol.* 177, 7784–7793.
- Matsuura, H., Momota, Y., Murata, K., Matsushima, H., Suzuki, N., Nomizu, M., Shinkai, H., Utani, A., 2004. Localization of the laminin alpha4 chain in the skin and identification of a heparin-dependent cell adhesion site within the laminin alpha4 chain C-terminal LG4 module. *J. Invest. Dermatol.* 122, 614–620.
- Maurel, P., Rauch, U., Flad, M., Margolis, R.K., Margolis, R.U., 1994. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2512–2516.
- Mazany, K.D., Peng, T., Watson, C.E., Tabas, I., Williams, K.J., 1998. Human chondroitin 6-sulfotransferase: cloning, gene structure, and chromosomal localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1407, 92–97.
- McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K.T., Tufaro, F., 2000. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 668–673.
- Meek, K.M., Quantock, A.J., Boote, C., Liu, C.Y., Kao, W.W.-Y., 2003. An X-ray scattering investigation of corneal structure in keratocan-deficient mice. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 22, 467–475.
- Meen, A.J., Oynebraten, I., Reine, T.M., Duelli, A., Svennevig, K., Pejler, G., Jenssen, T., Kolset, S.O., 2011. Serglycin Is a Major Proteoglycan in Polarized Human Endothelial Cells and Is Implicated in the Secretion of the Chemokine GRO /CXCL1. *J. Biol. Chem.* 286, 2636–2647.

- Meissen, J.K., Sweeney, M.D., Girardi, M., Lawrence, R., Esko, J.D., Leary, J.A., 2009. Differentiation of 3-O-sulfated heparin disaccharide isomers: Identification of structural aspects of the heparin CCL2 binding motif. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 652–657.
- Melrose, J., Smith, S., Whitelock, J., 2004. Perlecan immunolocalizes to perichondrial vessels and canals in human fetal cartilaginous primordia in early vascular and matrix remodeling events associated with diarthrodial joint development. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 52, 1405–1413.
- Merry, C.L., Lyon, M., Deakin, J.A., Hopwood, J.J., Gallagher, J.T., 1999. Highly sensitive sequencing of the sulfated domains of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 274, 18455–18462.
- Mikami, T., Kitagawa, H., 2013a. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4719–4733.
- Mikami, T., Kitagawa, H., 2013b. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4719–4733.
- Mikami, T., Mizumoto, S., Kago, N., Kitagawa, H., Sugahara, K., 2003. Specificities of three distinct human chondroitin/dermatan N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferases demonstrated using partially desulfated dermatan sulfate as an acceptor: implication of differential roles in dermatan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 36115–36127.
- Mikelis, C., Koutsoumpa, M., Papadimitriou, E., 2007. Pleiotrophin as a possible new target for angiogenesis-related diseases and cancer. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 2, 175–186.
- Mikelis, C., Sfaelou, E., Koutsoumpa, M., Kieffer, N., Papadimitriou, E., 2009. Integrin alpha(v)beta(3) is a pleiotrophin receptor required for pleiotrophin-induced endothelial cell migration through receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 1459–1469.
- Mikita, T., Campbell, D., Wu, P., Williamson, K., Schindler, U., 1996. Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5811–5820.
- Miyamoto, K., Asada, K., Fukutomi, T., Okochi, E., Yagi, Y., Hasegawa, T., Asahara, T., Sugimura, T., Ushijima, T., 2003. Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* 22, 274–280.
- Mizumoto, S., Ikegawa, S., Sugahara, K., 2013a. Human genetic disorders caused by mutations in genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 288, 10953–10961.
- Mizumoto, S., Mikami, T., Yasunaga, D., Kobayashi, N., Yamauchi, H., Miyake, A., Itoh, N., Kitagawa, H., Sugahara, K., 2009. Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 is required for somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish. *Biochem. J.* 419, 387–399.
- Mizumoto, S., Watanabe, M., Yamada, S., Sugahara, K., 2013b. Expression of N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase involved in chondroitin sulfate synthesis is responsible for pulmonary metastasis. *BioMed Res. Int.* 2013, 656319.
- Mizuno, K., Irie, S., Sato, T.A., 2001. Overexpression of EXTL3/EXTR1 enhances NF-kappaB activity induced by TNF-alpha. *Cell. Signal.* 13, 125–130.
- Mochida, Y., Parisuthiman, D., Yamauchi, M., 2006. Biglycan is a positive modulator of BMP-2 induced osteoblast differentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 585, 101–113.
- Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y., Kimata, K., 2008. Tetrasulfated Disaccharide Unit in Heparan Sulfate: ENZYMATIC FORMATION AND TISSUE DISTRIBUTION. *J. Biol. Chem.* 283, 31237–31245.
- Mohammadi, M., Olsen, S.K., Goetz, R., 2005a. A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an à la carte menu of heparan sulfate motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 506–516.
- Mohammadi, M., Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A., 2005b. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 107–137.
- Molawi, K., Sieweke, M.H., 2013. Transcriptional control of macrophage identity, self-renewal, and function. *Adv. Immunol.* 120, 269–300.
- Monzavi-Karbassi, B., Stanley, J.S., Hennings, L., Jousheghany, F., Artaud, C., Shaaf, S., Kieber-Emmons, T., 2007. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans as major P-selectin ligands on metastatic breast cancer cell lines. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 120, 1179–1191.

- Mookerjee-Basu, J., Vantourout, P., Martinez, L.O., Perret, B., Collet, X., Périgaud, C., Peyrottes, S., Champagne, E., 2010. F1-adenosine triphosphatase displays properties characteristic of an antigen presentation molecule for Vgamma9Vdelta2 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 6920–6928.
- Moon, A.F., Edavettal, S.C., Krahn, J.M., Munoz, E.M., Negishi, M., Linhardt, R.J., Liu, J., Pedersen, L.C., 2004. Structural analysis of the sulfotransferase (3-o-sulfotransferase isoform 3) involved in the biosynthesis of an entry receptor for herpes simplex virus 1. *J. Biol. Chem.* 279, 45185–45193.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. INTERLEUKIN -10 AND THE INTERLEUKIN -10 RECEPTOR. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765.
- Moreth, K., Iozzo, R.V., Schaefer, L., 2012. Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 2084–2091.
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C., Moretta, L., 2000. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* 21, 228–234.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, L., 2001. ACTIVATING RECEPTORS AND CORECEPTORS INVOLVED IN HUMAN NATURAL KILLER CELL-MEDIATED CYTOLYSIS. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 197–223.
- Morii, E., Ogihara, H., Oboki, K., Sawa, C., Sakuma, T., Nomura, S., Esko, J.D., Handa, H., Kitamura, Y., 2001. Inhibitory effect of the microRNA transcription factor encoded by the mutant microRNA allele on GABP binding protein-mediated transcript expression in mouse mast cells. *Blood* 97, 3032–3039.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S., Rosen, S.D., 2002. Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *J. Biol. Chem.* 277, 49175–49185.
- Morita, M., Motoki, K., Akimoto, K., Natori, T., Sakai, T., Sawa, E., Yamaji, K., Koezuka, Y., Kobayashi, E., Fukushima, H., 1995. Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J. Med. Chem.* 38, 2176–2187.
- Morita, R., Fujimoto, A., Hatta, N., Takehara, K., Takata, M., 1998. Comparison of genetic profiles between primary melanomas and their metastases reveals genetic alterations and clonal evolution during progression. *J. Invest. Dermatol.* 111, 919–924.
- Moses, J., Oldberg, A., Fransson, L.A., 1999. Initiation of galactosaminoglycan biosynthesis. Separate galactosylation and dephosphorylation pathways for phosphoxylosylated decorin protein and exogenous xyloside. *Eur. J. Biochem. FEBS* 260, 879–884.
- Motz, G.T., Coukos, G., 2011. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 702–711.
- Mouillot, G., Marcou, C., Zidi, I., Guillard, C., Sangrouber, D., Carosella, E.D., Moreau, P., 2007. Hypoxia modulates HLA-G gene expression in tumor cells. *Hum. Immunol.* 68, 277–285.
- Movahedi, K., Williams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J.A., 2008. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111, 4233–4244.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stange, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J.A., 2010. Different Tumor Microenvironments Contain Functionally Distinct Subsets of Macrophages Derived from Ly6C(high) Monocytes. *Cancer Res.* 70, 5728–5739.
- Mulloy, B., Forster, M.J., 2000. Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology* 10, 1147–1156.
- Mumm, J.B., Oft, M., 2011. Subversion and coercion: the art of redirecting tumor immune surveillance. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 344, 25–39.
- Mundhenke, C., Meyer, K., Drew, S., Friedl, A., 2002. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am. J. Pathol.* 160, 185–194.
- Muñoz, E., Xu, D., Kemp, M., Zhang, F., Liu, J., Linhardt, R.J., 2006. Affinity, kinetic, and structural study of the interaction of 3-O-sulfotransferase isoform 1 with heparan sulfate. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 5122–5128.
- Muramatsu, T., 2002. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 359–371.

- Murphy, K.J., McLay, N., Pye, D.A., 2008. Structural studies of heparan sulfate hexasaccharides: new insights into iduronate conformational behavior. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 12435–12444.
- Nadanaka, S., Fujita, M., Sugahara, K., 1999. Demonstration of a novel sulfotransferase in fetal bovine serum, which transfers sulfate to the C6 position of the GalNAc residue in the sequence iduronic acid alpha1-3GalNAc beta1-4iduronic acid in dermatan sulfate. *FEBS Lett.* 452, 185–189.
- Nagai, N., Habuchi, H., Kitazume, S., Toyoda, H., Hashimoto, Y., Kimata, K., 2007. Regulation of heparan sulfate 6-O-sulfation by beta-secretase activity. *J. Biol. Chem.* 282, 14942–14951.
- Nagamine, S., Keino-Masu, K., Shiomi, K., Masu, M., 2010. Proteolytic cleavage of the rat heparan sulfate 6-O-endosulfatase SulfFP2 by furin-type proprotein convertases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 107–112.
- Nagamine, S., Tamba, M., Ishimine, H., Araki, K., Shiomi, K., Okada, T., Ohto, T., Kunita, S., Takahashi, S., Wisnianski, R.G.P., van Kuppevelt, T.H., Masu, M., Keino-Masu, K., 2012. Organ-specific sulfation patterns of heparan sulfate generated by extracellular sulfatases Sulf1 and Sulf2 in mice. *J. Biol. Chem.* 287, 9579–9590.
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D.L., Schneck, J., Gabrilovich, D.I., 2007. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* 13, 828–835.
- Nakao, M., Shichijo, S., Imaizumi, T., Inoue, Y., Matsunaga, K., Yamada, A., Kikuchi, M., Tsuda, N., Ohta, K., Takamori, S., Yamana, H., Fujita, H., Itoh, K., 2000. Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 2565–2574.
- Nandi, S., 2006. Developmental and functional significance of the CSF-1 proteoglycan chondroitin sulfate chain. *Blood* 107, 786–795.
- Nandi, S., Cioce, M., Yeung, Y.-G., Nieves, E., Tesfa, L., Lin, H., Hsu, A.W., Halenbeck, R., Cheng, H.-Y., Gokhan, S., Mehler, M.F., Stanley, E.R., 2013. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J. Biol. Chem.* 288, 21972–21986.
- Nausch, N., Galani, I.E., Schlecker, E., Cerwenka, A., 2008. Mononuclear myeloid-derived “suppressor” cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood* 112, 4080–4089.
- Nelms, K., Keegan, A.D., Zamorano, J., Ryan, J.J., Paul, W.E., 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 701–738.
- Nelson, R.M., Cecconi, O., Roberts, W.G., Aruffo, A., Linhardt, R.J., Bevilacqua, M.P., 1993. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 82, 3253–3258.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., Massagué, J., 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* 9, 274–284.
- Nguyen, T.H., 2004. Mechanisms of metastasis. *Clin. Dermatol.* 22, 209–216.
- Nguyen, T.K.N., Arungundram, S., Tran, V.M., Raman, K., Al-Mafraji, K., Venot, A., Boons, G.-J., Kuberan, B., 2012. A synthetic heparan sulfate oligosaccharide library reveals the novel enzymatic action of d-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3a. *Mol. Biosyst.* 8, 609.
- Nikitovic, D., Berdiaki, A., Zafiroopoulos, A., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N., 2008a. Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. *FEBS J.* 275, 350–361.
- Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N., 2008b. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life* 60, 818–823.
- Nilsson, T., Warren, G., 1994. Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 517–521.
- Ninomiya, T., Sugiura, N., Tawada, A., Sugimoto, K., Watanabe, H., Kimata, K., 2002. Molecular cloning and characterization of chondroitin polymerase from Escherichia coli strain K4. *J. Biol. Chem.* 277, 21567–21575.
- Nizar, S., Copier, J., Meyer, B., Bodman-Smith, M., Galustian, C., Kumar, D., Dalglish, A., 2009. T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy? *Br. J. Cancer* 100, 1697–1703.
- Nuka, S., Zhou, W., Henry, S.P., Gendron, C.M., Schultz, J.B., Shinomura, T., Johnson, J., Wang, Y., Keene, D.R., Ramírez-Solis, R., Behringer, R.R., Young, M.F., Höök, M., 2010. Phenotypic characterization of epiphycan-deficient and epiphycan/biglycan double-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 88–96.
- Nusgens, B.-V., 2010. Acide hyaluronique et matrice extracellulaire : une molécule primitive ? *Ann. Dermatol. Vénérologie* 137, S3–S8.

- Ochoa, A.C., Zea, A.H., Hernandez, C., Rodriguez, P.C., 2007. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 721s–726s.
- O'Donnell, C.D., Kovacs, M., Akhtar, J., Valyi-Nagy, T., Shukla, D., 2010. Expanding the role of 3-O sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus type-1 entry. *Virology* 397, 389–398.
- Ohtake-Niimi, S., Kondo, S., Ito, T., Kakehi, S., Ohta, T., Habuchi, H., Kimata, K., Habuchi, O., 2010. Mice deficient in N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase are unable to synthesize chondroitin/dermatan sulfate containing N-acetylgalactosamine 4,6-bissulfate residues and exhibit decreased protease activity in bone marrow-derived mast cells. *J. Biol. Chem.* 285, 20793–20805.
- Ohtake, S., Ito, Y., Fukuta, M., Habuchi, O., 2001. Human N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase cDNA is related to human B cell recombination activating gene-associated gene. *J. Biol. Chem.* 276, 43894–43900.
- Ohtake, S., Kimata, K., Habuchi, O., 2005. Recognition of sulfation pattern of chondroitin sulfate by uronosyl 2-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 280, 39115–39123.
- Ohto, T., Uchida, H., Yamazaki, H., Keino-Masu, K., Matsui, A., Masu, M., 2002. Identification of a novel nonlysosomal sulphatase expressed in the floor plate, choroid plexus and cartilage. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 7, 173–185.
- Ojalvo, L.S., King, W., Cox, D., Pollard, J.W., 2009. High-Density Gene Expression Analysis of Tumor-Associated Macrophages from Mouse Mammary Tumors. *Am. J. Pathol.* 174, 1048–1064.
- Oleinika, K., Nibbs, R.J., Graham, G.J., Fraser, A.R., 2013. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clin. Exp. Immunol.* 171, 36–45.
- Olson, S.T., Björk, I., Bock, S.C., 2002a. Identification of critical molecular interactions mediating heparin activation of antithrombin: implications for the design of improved heparin anticoagulants. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 198–205.
- Olson, S.T., Chuang, Y.-J., 2002b. Heparin activates antithrombin anticoagulant function by generating new interaction sites (exosites) for blood clotting proteinases. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 331–338.
- Olson, S.T., Richard, B., Izaguirre, G., Schedin-Weiss, S., Gettins, P.G.W., 2010. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 92, 1587–1596.
- Oohira, A., Shuo, T., Tokita, Y., Nakanishi, K., Aono, S., 2004. Neuroglycan C, a brain-specific part-time proteoglycan, with a particular multidomain structure. *Glycoconj. J.* 21, 53–57.
- Opat, A.S., Houghton, F., Gleeson, P.A., 2000. Medial Golgi but not late Golgi glycosyltransferases exist as high molecular weight complexes. Role of luminal domain in complex formation and localization. *J. Biol. Chem.* 275, 11836–11845.
- Orellana, A., Hirschberg, C.B., Wei, Z., Swiedler, S.J., Ishihara, M., 1994. Molecular cloning and expression of a glycosaminoglycan N-acetylglucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase from a heparin-producing cell line. *J. Biol. Chem.* 269, 2270–2276.
- Ori, A., Wilkinson, M.C., Fernig, D.G., 2008. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 4309–4338.
- Osawa, T., Sugiura, N., Shimada, H., Hirooka, R., Tsuji, A., Shirakawa, T., Fukuyama, K., Kimura, M., Kimata, K., Kakuta, Y., 2009. Crystal structure of chondroitin polymerase from *Escherichia coli* K4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 10–14.
- Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., 2009. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *J. Immunol.* 182, 4499–4506.
- Pacheco, B., Maccarana, M., Goodlett, D.R., Malmström, A., Malmström, L., 2009a. Identification of the active site of DS-epimerase 1 and requirement of N-glycosylation for enzyme function. *J. Biol. Chem.* 284, 1741–1747.
- Pacheco, B., Malmström, A., Maccarana, M., 2009b. Two dermatan sulfate epimerases form iduronic acid domains in dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* 284, 9788–9795.
- Paget, S., 1989. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 8, 98–101.

- Pallerla, S.R., Lawrence, R., Lewejohann, L., Pan, Y., Fischer, T., Schlomann, U., Zhang, X., Esko, J.D., Grobe, K., 2008. Altered heparan sulfate structure in mice with deleted NDST3 gene function. *J. Biol. Chem.* 283, 16885–16894.
- Palumbo, J.S., Talmage, K.E., Massari, J.V., La Jeunesse, C.M., Flick, M.J., Kombrinck, K.W., Hu, Z., Barney, K.A., Degen, J.L., 2007. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* 110, 133–141.
- Pan, P.-Y., Wang, G.X., Yin, B., Ozao, J., Ku, T., Divino, C.M., Chen, S.-H., 2008. Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 111, 219–228.
- Pantazaka, E., Papadimitriou, E., 2014. Chondroitin sulfate-cell membrane effectors as regulators of growth factor-mediated vascular and cancer cell migration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1840, 2643–2650.
- Parish, C.R., 2006. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 633–643.
- Park, J.M., Terabe, M., van den Broeke, L.T., Donaldson, D.D., Berzofsky, J.A., 2005. Unmasking immunosurveillance against a syngeneic colon cancer by elimination of CD4+ NKT regulatory cells and IL-13. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 114, 80–87.
- Paulick, M.G., Bertozzi, C.R., 2008. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 6991–7000.
- Pawelek, J.M., Chakraborty, A.K., 2008. Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 377–386.
- Pedersen, L.C., Dong, J., Taniguchi, F., Kitagawa, H., Krahn, J.M., Pedersen, L.G., Sugahara, K., Negishi, M., 2003. Crystal structure of an alpha 1,4-N-acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a member of the exostosin gene family involved in heparan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 14420–14428.
- Pedroza-Gonzalez, A., Xu, K., Wu, T.-C., Aspod, C., Tindle, S., Marches, F., Gallegos, M., Burton, E.C., Savino, D., Hori, T., Tanaka, Y., Zurawski, S., Zurawski, G., Bover, L., Liu, Y.-J., Banchereau, J., Palucka, A.K., 2011. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J. Exp. Med.* 208, 479–490.
- Pejler, G., Abrink, M., Wernersson, S., 2009. Serglycin proteoglycan: regulating the storage and activities of hematopoietic proteases. *BioFactors Oxf. Engl.* 35, 61–68.
- Pellegrini, L., Burke, D.F., von Delft, F., Mulloy, B., Blundell, T.L., 2000. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 407, 1029–1034.
- Pellet-Many, C., Frankel, P., Jia, H., Zachary, I., 2008. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem. J.* 411, 211–226.
- Petersen, T.R., Dickgreber, N., Hermans, I.F., 2010. Tumor antigen presentation by dendritic cells. *Crit. Rev. Immunol.* 30, 345–386.
- Peterson, S.M., Iskenderian, A., Cook, L., Romashko, A., Tobin, K., Jones, M., Norton, A., Gómez-Yafal, A., Heartlein, M.W., Concino, M.F., Liaw, L., Martini, P.G.V., 2010. Human Sulfatase 2 inhibits in vivo tumor growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. *BMC Cancer* 10, 427.
- Petitou, M., Casu, B., Lindahl, U., 2003. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. *Biochimie* 85, 83–89.
- Petrey, A.C., de la Motte, C.A., 2014. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front. Immunol.* 5, 101.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pfeiffer, S., Ricardo, S., Manneville, J.-B., Alexandre, C., Vincent, J.-P., 2002. Producing cells retain and recycle Wingless in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol. CB* 12, 957–962.
- Piccard, H., Muschel, R.J., Opendakker, G., 2012. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 82, 296–309.
- Pichert, A., Schlorke, D., Franz, S., Arnhold, J., 2012. Functional aspects of the interaction between interleukin-8 and sulfated glycosaminoglycans. *Biomatter* 2, 142–148.
- Pierce, B.L., Ballard-Barbash, R., Bernstein, L., Baumgartner, R.N., Neuhaus, M.L., Wener, M.H., Baumgartner, K.B., Gilliland, F.D., Sorensen, B.E., McTiernan, A., Ulrich, C.M., 2009.

- Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 3437–3444.
- Pikas, D.S., Eriksson, I., Kjellén, L., 2000. Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 4552–4558.
- Pinhal, M.A., Smith, B., Olson, S., Aikawa, J., Kimata, K., Esko, J.D., 2001. Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12984–12989.
- Pirilä, E., Ramamurthy, N.S., Sorsa, T., Salo, T., Hietanen, J., Maisi, P., 2003. Gelatinase A (MMP-2), collagenase-2 (MMP-8), and laminin-5 gamma2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (ulcerative colitis). *Dig. Dis. Sci.* 48, 93–98.
- Pisconti, A., Cornelison, D.D.W., Olguín, H.C., Antwine, T.L., Olwin, B.B., 2010. Syndecan-3 and Notch cooperate in regulating adult myogenesis. *J. Cell Biol.* 190, 427–441.
- Pistoia, V., Morandi, F., Wang, X., Ferrone, S., 2007. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin. Cancer Biol.* 17, 469–479.
- Polakis, P., 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14, 1837–1851.
- Polytarchou, C., Hatzia Apostolou, M., Poimenidi, E., Mikelis, C., Papadopoulou, A., Parthymou, A., Papadimitriou, E., 2009. Nitric oxide stimulates migration of human endothelial and prostate cancer cells through up-regulation of pleiotrophin expression and its receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 124, 1785–1793.
- Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A., 2003. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 33–45.
- Potapenko, I.O., Haakensen, V.D., Lüders, T., Helland, A., Bukholm, I., Sørli, T., Kristensen, V.N., Lingjaerde, O.C., Børresen-Dale, A.-L., 2010. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol. Oncol.* 4, 98–118.
- Powers, R., Garrett, D.S., March, C.J., Frieden, E.A., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., 1992. 1H, 15N, 13C, and 13CO assignments of human interleukin-4 using three-dimensional double- and triple-resonance heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry (Mosc.)* 31, 4334–4346.
- Prado-García, H., Romero-García, S., Aguilar-Cazares, D., Meneses-Flores, M., Lopez-Gonzalez, J.S., 2012. Tumor-Induced CD8+ T-Cell Dysfunction in Lung Cancer Patients. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 1–11.
- Prévost-Blondel, A., Roth, E., Rosenthal, F.M., Pircher, H., 2000. Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 3645–3651.
- Price, M.A., Colvin Wanshura, L.E., Yang, J., Carlson, J., Xiang, B., Li, G., Ferrone, S., Dudek, A.Z., Turley, E.A., McCarthy, J.B., 2011. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma: CSPG4, a multifunctional cell surface proteoglycan in melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 1148–1157.
- Prochazka, L., Tesarik, R., Turanek, J., 2014. Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell. Signal.* 26, 2234–2239.
- Properzi, F., Lin, R., Kwok, J., Naidu, M., van Kuppevelt, T.H., Ten Dam, G.B., Camargo, L.M., Raha-Chowdhury, R., Furukawa, Y., Mikami, T., Sugahara, K., Fawcett, J.W., 2008. Heparan sulphate proteoglycans in glia and in the normal and injured CNS: expression of sulphotransferases and changes in sulphation. *Eur. J. Neurosci.* 27, 593–604.
- Proudfoot, A.E.I., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N.C., Kosco-Vilbois, M.H., 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1885–1890.
- Prudnikova, T.Y., Mostovich, L.A., Domanitskaya, N.V., Pavlova, T.V., Kashuba, V.I., Zabarovsky, E.R., Grigorieva, E.V., 2010. Antiproliferative effect of D-glucuronyl C5-epimerase in human breast cancer cells. *Cancer Cell Int.* 10, 27.
- Prudnikova, T.Y., Mostovich, L.A., Kashuba, V.I., Ernberg, I., Zabarovsky, E.R., Grigorieva, E.V., 2012. miRNA-218 contributes to the regulation of D-glucuronyl C5-epimerase expression in normal and tumor breast tissues. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* 7, 1109–1114.

- Prudnikova, T.Y., Soultziz, N., Kutsenko, O.S., Mostovich, L.A., Haraldson, K., Ernberg, I., Kashuba, V.I., Spandidos, D.A., Zabarovsky, E.R., Grigorieva, E.V., 2013. Heterogeneity of d-glucuronyl C5-epimerase expression and epigenetic regulation in prostate cancer. *Cancer Med.* 2, 654–661.
- Prydz, K., Dalen, K.T., 2000. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell Sci.* 113 Pt 2, 193–205.
- Pugia, M.J., Valdes, R., Jortani, S.A., 2007. Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement. *Adv. Clin. Chem.* 44, 223–245.
- Purushothaman, A., Fukuda, J., Mizumoto, S., ten Dam, G.B., van Kuppevelt, T.H., Kitagawa, H., Mikami, T., Sugahara, K., 2007. Functions of chondroitin sulfate/dermatan sulfate chains in brain development. Critical roles of E and iE disaccharide units recognized by a single chain antibody GD3G7. *J. Biol. Chem.* 282, 19442–19452.
- Pye, D.A., Vives, R.R., Turnbull, J.E., Hyde, P., Gallagher, J.T., 1998. Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* 273, 22936–22942.
- Qian, B.-Z., Pollard, J.W., 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.
- Quantock, A.J., Young, R.D., Akama, T.O., 2010. Structural and biochemical aspects of keratan sulphate in the cornea. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 891–906.
- Quaranta, V., 2000. Cell migration through extracellular matrix: membrane-type metalloproteinases make the way. *J. Cell Biol.* 149, 1167–1170.
- Quezada, S.A., Peggs, K.S., Simpson, T.R., Allison, J.P., 2011. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol. Rev.* 241, 104–118.
- Rabenstein, D.L., 2002. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat. Prod. Rep.* 19, 312–331.
- Ra, H.-J., Harju-Baker, S., Zhang, F., Linhardt, R.J., Wilson, C.L., Parks, W.C., 2009. Control of promatrilysin (MMP7) activation and substrate-specific activity by sulfated glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 284, 27924–27932.
- Ramana, C.V., Chatterjee-Kishore, M., Nguyen, H., Stark, G.R., 2000. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 19, 2619–2627.
- Ramani, V.C., Yang, Y., Ren, Y., Nan, L., Sanderson, R.D., 2011. Heparanase plays a dual role in driving hepatocyte growth factor (HGF) signaling by enhancing HGF expression and activity. *J. Biol. Chem.* 286, 6490–6499.
- Rapraeger, A.C., 2001. Molecular interactions of syndecans during development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 107–116.
- Raspanti, M., Viola, M., Forlino, A., Tenni, R., Gruppi, C., Tira, M.E., 2008. Glycosaminoglycans show a specific periodic interaction with type I collagen fibrils. *J. Struct. Biol.* 164, 134–139.
- Rauch, U., Feng, K., Zhou, X.H., 2001. Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 1842–1856.
- Raulet, D.H., 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 781–790.
- Reed, C.C., Waterhouse, A., Kirby, S., Kay, P., Owens, R.T., McQuillan, D.J., Iozzo, R.V., 2005. Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer. *Oncogene* 24, 1104–1110.
- Reiman, J.M., Kmiecik, M., Manjili, M.H., Knutson, K.L., 2007. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* 17, 275–287.
- Reizes, O., Benoit, S.C., Strader, A.D., Clegg, D.J., Akunuru, S., Seeley, R.J., 2003. Syndecan-3 modulates food intake by interacting with the melanocortin/AgRP pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 994, 66–73.
- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., Sisirak, V., 2011. Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 163–183.
- Rek, A., Krenn, E., Kungl, A.J., 2009. Therapeutically targeting protein-glycan interactions. *Br. J. Pharmacol.* 157, 686–694.
- Reymond, N., d'Água, B.B., Ridley, A.J., 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 13, 858–870.
- Ricard-Blum, S., Féraud, O., Lortat-Jacob, H., Rencurosi, A., Fukai, N., Dkhissi, F., Vittet, D., Imberty, A., Olsen, B.R., van der Rest, M., 2004. Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations. *J. Biol. Chem.* 279, 2927–2936.

- Rincon-Orozco, B., Kunzmann, V., Wrobel, P., Kabelitz, D., Steinle, A., Herrmann, T., 2005. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 2144–2151.
- Ringvall, M., Kjellén, L., 2010. Mice deficient in heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 1. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 93, 35–58.
- Ringvall, M., Ledin, J., Holmborn, K., van Kuppevelt, T., Ellin, F., Eriksson, I., Olofsson, A.M., Kjellen, L., Forsberg, E., 2000. Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. *J. Biol. Chem.* 275, 25926–25930.
- Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D.C., Mostowski, H., Norcross, M.A., 1995. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J. Virol.* 69, 2233–2239.
- Rodriguez, P.C., Hernandez, C.P., Quiceno, D., Dubinett, S.M., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., Gilbert, J., Ochoa, A.C., 2005. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J. Exp. Med.* 202, 931–939.
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., Levings, M.K., 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* 182, 68–79.
- Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., 2000. Expression of heparan sulphate L-iduronyl 2-O-sulphotransferase in human kidney 293 cells results in increased D-glucuronyl 2-O-sulphation. *Biochem. J.* 346 Pt 2, 463–468.
- Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., 2001. Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 5548–5555.
- Rosenberg, R.D., Damus, P.S., 1973. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* 248, 6490–6505.
- Rosenberg, R.D., Shworak, N.W., Liu, J., Schwartz, J.J., Zhang, L., 1997. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J. Clin. Invest.* 99, 2062–2070.
- Rotondo, R., Barisione, G., Mastracci, L., Grossi, F., Orengo, A.M., Costa, R., Truini, M., Fabbi, M., Ferrini, S., Barbieri, O., 2009. IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 125, 887–893.
- Roughley, P.J., 2006. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur. Cell. Mater.* 12, 92–101.
- Rozel, S., Galbán, C.J., Nicolay, K., Lee, K.C., Sud, S., Neeley, C., Snyder, L.A., Chenevert, T.L., Rehemtulla, A., Ross, B.D., Pienta, K.J., 2009. Synergy between anti-CCL2 and docetaxel as determined by DW-MRI in a metastatic bone cancer model. *J. Cell. Biochem.* 107, 58–64.
- Ruffell, B., Affara, N.I., Coussens, L.M., 2012. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 33, 119–126.
- Saesens, E., Sarrazin, S., Laguri, C., Sadir, R., Maurin, D., Thomas, A., Imberty, A., Lortat-Jacob, H., 2013. Insights into the mechanism by which interferon- γ basic amino acid clusters mediate protein binding to heparan sulfate. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 9384–9390.
- Safaiyan, F., Lindahl, U., Salmivirta, M., 2000. Structural diversity of N-sulfated heparan sulfate domains: distinct modes of glucuronyl C5 epimerization, iduronic acid 2-O-sulfation, and glucosamine 6-O-sulfation. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 10823–10830.
- Sakko, A.J., Ricciardelli, C., Mayne, K., Suwihat, S., LeBaron, R.G., Marshall, V.R., Tilley, W.D., Horsfall, D.J., 2003. Modulation of prostate cancer cell attachment to matrix by versican. *Cancer Res.* 63, 4786–4791.
- Salih, H.R., 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 102, 1389–1396.
- Salimath, P.V., Spiro, R.C., Freeze, H.H., 1995. Identification of a novel glycosaminoglycan core-like molecule. II. Alpha-GalNAc-capped xylosides can be made by many cell types. *J. Biol. Chem.* 270, 9164–9168.
- Sameni, M., Cavallo-Medved, D., Dosesescu, J., Jedeszko, C., Moin, K., Mullins, S.R., Olive, M.B., Rudy, D., Sloane, B.F., 2009. Imaging and quantifying the dynamics of tumor-associated proteolysis. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 299–309.
- Santra, M., Reed, C.C., Iozzo, R.V., 2002. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J. Biol. Chem.* 277, 35671–35681.

- Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J.K., Mosher, D.F., Robinson, S.D., Hynes, R.O., Goetinck, P.F., 1999. Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2805–2810.
- Sarrazin, S., Adam, E., Lyon, M., Depontieu, F., Motte, V., Landolfi, C., Lortat-Jacob, H., Bechard, D., Lassalle, P., Delehedde, M., 2006. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1765, 25–37.
- Sarrazin, S., Lyon, M., Deakin, J.A., Guerrini, M., Lassalle, P., Delehedde, M., Lortat-Jacob, H., 2010. Characterization and binding activity of the chondroitin/dermatan sulfate chain from Endocan, a soluble endothelial proteoglycan. *Glycobiology* 20, 1380–1388.
- Sasisekharan, R., Raman, R., Prabhakar, V., 2006. Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 181–231.
- Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G., Narayanasami, U., 2002. Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 521–528.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjjatic, S., Ambrosone, C., Kepner, J., Odunsi, T., Ritter, G., Lele, S., Chen, Y.-T., Ohtani, H., Old, L.J., Odunsi, K., 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18538–18543.
- Sato, T., Gotoh, M., Kiyohara, K., Akashima, T., Iwasaki, H., Kameyama, A., Mochizuki, H., Yada, T., Inaba, N., Togayachi, A., Kudo, T., Asada, M., Watanabe, H., Imamura, T., Kimata, K., Narimatsu, H., 2003. Differential roles of two N-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2. Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* 278, 3063–3071.
- Sato, T., Terai, M., Tamura, Y., Alexeev, V., Mastrangelo, M.J., Selvan, S.R., 2011. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol. Res.* 51, 170–182.
- Satthaporn, S., Eremin, O., 2001. Dendritic cells (I): Biological functions. *J. R. Coll. Surg. Edinb.* 46, 9–19.
- Schaefer, L., Iozzo, R.V., 2008. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J. Biol. Chem.* 283, 21305–21309.
- Schaefer, L., Schaefer, R.M., 2010. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 339, 237–246.
- Schick, B.P., 2010. Serglycin Proteoglycan Deletion in Mouse Platelets. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 235–287.
- Schioppa, T., Moore, R., Thompson, R.G., Rosser, E.C., Kulbe, H., Nedospasov, S., Mauri, C., Coussens, L.M., Balkwill, F.R., 2011. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10662–10667.
- Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahim, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J., Mohammadi, M., 2000. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell* 6, 743–750.
- Schönherr, E., Sunderkötter, C., Iozzo, R.V., Schaefer, L., 2005. Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J. Biol. Chem.* 280, 15767–15772.
- Schrage, Y.M., Hameetman, L., Szuhai, K., Cleton-Jansen, A.-M., Taminiau, A.H.M., Hogendoorn, P.C.W., Bovée, J.V.M.G., 2009. Aberrant heparan sulfate proteoglycan localization, despite normal exostosin, in central chondrosarcoma. *Am. J. Pathol.* 174, 979–988.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565–1570.
- Schreiber, T.H., Raez, L., Rosenblatt, J.D., Podack, E.R., 2010. Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art. *Semin. Immunol.* 22, 105–112.
- Schultz, G.S., Wysocki, A., 2009. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 17, 153–162.
- Scotet, E., Martinez, L.O., Grant, E., Barbaras, R., Jenö, P., Guiraud, M., Monsarrat, B., Saulquin, X., Maillet, S., Estève, J.-P., Lopez, F., Perret, B., Collet, X., Bonneville, M., Champagne, E., 2005.

- Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 22, 71–80.
- Scott, J.E., 2001. Structure and function in extracellular matrices depend on interactions between anionic glycosaminoglycans. *Pathol. Biol. (Paris)* 49, 284–289.
- Scully, O.J., Chua, P.-J., Harve, K.S., Bay, B.-H., Yip, G.W., 2012. Serglycin in health and diseases. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* 295, 1415–1420.
- Sedita, J., Izvolsky, K., Cardoso, W.V., 2004. Differential expression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase isoforms in the mouse embryo suggests distinctive roles during organogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 231, 782–794.
- Seffouh, A., Milz, F., Przybylski, C., Laguri, C., Oosterhof, A., Bourcier, S., Sadir, R., Dutkowski, E., Daniel, R., van Kuppevelt, T.H., Dierks, T., Lortat-Jacob, H., Vivès, R.R., 2013. HSulf sulfatases catalyze processive and oriented 6-O-desulfation of heparan sulfate that differentially regulates fibroblast growth factor activity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 2431–2439.
- Segal, N.H., Parsons, D.W., Peggs, K.S., Velculescu, V., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Allison, J.P., 2008. Epitope Landscape in Breast and Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 68, 889–892.
- Seidler, D.G., Dreier, R., 2008. Decorin and its galactosaminoglycan chain: Extracellular regulator of cellular function? *IUBMB Life* 60, 729–733.
- Seliger, B., Maeurer, M.J., Ferrone, S., 2000. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today* 21, 455–464.
- Senay, C., Lind, T., Muguruma, K., Tone, Y., Kitagawa, H., Sugahara, K., Lidholt, K., Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., 2000. The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO Rep.* 1, 282–286.
- Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K.A., Tan, G., Bronte, V., Borrello, I., 2004. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 64, 6337–6343.
- Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., Bronte, V., Borrello, I., 2006. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.* 203, 2691–2702.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
- Sharifi, N., Hurt, E.M., Kawasaki, B.T., Farrar, W.L., 2007. TGFBR3 loss and consequences in prostate cancer. *The Prostate* 67, 301–311.
- Shaulian, E., Karin, M., 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390–2400.
- Shevach, E.M., 2002. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 389–400.
- Shintani, Y., Takashima, S., Asano, Y., Kato, H., Liao, Y., Yamazaki, S., Tsukamoto, O., Seguchi, O., Yamamoto, H., Fukushima, T., Sugahara, K., Kitakaze, M., Hori, M., 2006. Glycosaminoglycan modification of neuropilin-1 modulates VEGFR2 signaling. *EMBO J.* 25, 3045–3055.
- Shivapurkar, N., Sherman, M.E., Stastny, V., Echebiri, C., Rader, J.S., Nayar, R., Bonfiglio, T.A., Gazdar, A.F., Wang, S.S., 2007. Evaluation of candidate methylation markers to detect cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 107, 549–553.
- Shriver, Z., Capila, I., Venkataraman, G., Sasisekharan, R., 2012. Heparin and heparan sulfate: analyzing structure and microheterogeneity. *Handb. Exp. Pharmacol.* 159–176.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N.W., Bai, X., Esko, J.D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Rosenberg, R.D., Spear, P.G., 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99, 13–22.
- Shworak, N.W., HajMohammadi, S., de Agostini, A.I., Rosenberg, R.D., 2002. Mice deficient in heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-1: normal hemostasis with unexpected perinatal phenotypes. *Glycoconj. J.* 19, 355–361.
- Shworak, N.W., Liu, J., Fritze, L.M., Schwartz, J.J., Zhang, L., Logeart, D., Rosenberg, R.D., 1997. Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 272, 28008–28019.
- Shworak, N.W., Liu, J., Petros, L.M., Zhang, L., Kobayashi, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Rosenberg, R.D., 1999. Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-

- sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci. *J. Biol. Chem.* 274, 5170–5184.
- Siegel, R.M., Chan, F.K., Chun, H.J., Lenardo, M.J., 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 1, 469–474.
- Silbert, J.E., Sugumaran, G., 2002. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life* 54, 177–186.
- Simhadri, V.R., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Topolar, D., Simhadri, V.L., Nohroudi, K., Kufer, T.A., Engert, A., Pogge von Strandmann, E., 2008. Dendritic Cells Release HLA-B-Associated Transcript-3 Positive Exosomes to Regulate Natural Killer Function. *PLoS ONE* 3, e3377.
- Simons, M., Horowitz, A., 2001. Syndecan-4-mediated signalling. *Cell. Signal.* 13, 855–862.
- Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M., Ostrand-Rosenberg, S., 2007. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 977–983.
- Sinha, P., Clements, V.K., Ostrand-Rosenberg, S., 2005. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 636–645.
- Smeds, E., Habuchi, H., Do, A.-T., Hjertson, E., Grundberg, H., Kimata, K., Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., 2003. Substrate specificities of mouse heparan sulphate glucosaminyl 6-O-sulphotransferases. *Biochem. J.* 372, 371–380.
- Smith, H.A., Kang, Y., 2013. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 411–429.
- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., Dommelen, S.L.H. van, Degli-Esposti, M.A., Hayakawa, Y., 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 42, 501–510.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., Schreiber, R.D., 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 90, 1–50.
- Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 850–861.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Cretney, E., Kelly, J.M., Snook, M.B., Forbes, C.A., Scalzo, A.A., 1999. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 6658–6662.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., Godfrey, D.I., 2000a. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* 191, 661–668.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., Trapani, J.A., 2000b. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* 192, 755–760.
- Sofeu Feugaing, D.D., Götte, M., Viola, M., 2013. More than matrix: The multifaceted role of decorin in cancer. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 1–11.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P., 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 86, 1065–1073.
- Song, K., Li, Q., Jiang, Z.-Z., Guo, C.-W., Li, P., 2011. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3B1, a novel epithelial-mesenchymal transition inducer in pancreatic cancer. *Cancer Biol. Ther.* 12, 388–398.
- Song, X., Krelin, Y., Dvorkin, T., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C.A., Voronov, E., Apte, R.N., 2005. CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 8200–8208.
- Spillmann, D., 2001. Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie* 83, 811–817.
- Spillmann, D., Witt, D., Lindahl, U., 1998. Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 273, 15487–15493.
- Sprague, L., Muccioli, M., Pate, M., Meles, E., McGinty, J., Nandigam, H., Venkatesh, A.K., Gu, M.-Y., Mansfield, K., Rutowski, A., Omosebi, O., Courreges, M.C., Benencia, F., 2011. The interplay between surfaces and soluble factors define the immunologic and angiogenic properties of myeloid dendritic cells. *BMC Immunol.* 12, 35.

- Stallcup, W.B., Huang, F.-J., 2008. A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adhes. Migr.* 2, 192–201.
- Stanford, K.I., Wang, L., Castagnola, J., Song, D., Bishop, J.R., Brown, J.R., Lawrence, R., Bai, X., Habuchi, H., Tanaka, M., Cardoso, W.V., Kimata, K., Esko, J.D., 2010. Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase is required for triglyceride-rich lipoprotein clearance. *J. Biol. Chem.* 285, 286–294.
- Stanley, E.R., Chitu, V., 2014. CSF-1 Receptor Signaling in Myeloid Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a021857–a021857.
- Stary, G., Bangert, C., Tauber, M., Strohal, R., Kopp, T., Stingl, G., 2007. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 1441–1451.
- Stevens, R.L., Fox, C.C., Lichtenstein, L.M., Austen, K.F., 1988. Identification of chondroitin sulfate E proteoglycans and heparin proteoglycans in the secretory granules of human lung mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 2284–2287.
- Stewart, T.J., Abrams, S.I., 2008. How tumours escape mass destruction. *Oncogene* 27, 5894–5903.
- Stout, R.D., Watkins, S.K., Suttles, J., 2009. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 86, 1105–1109.
- Strell, C., Entschladen, F., 2008. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun. Signal. CCS* 6, 10.
- Stringer, S.E., Forster, M.J., Mulloy, B., Bishop, C.R., Graham, G.J., Gallagher, J.T., 2002. Characterization of the binding site on heparan sulfate for macrophage inflammatory protein 1alpha. *Blood* 100, 1543–1550.
- Strioga, M., Schijns, V., Powell, D.J., Pasukoniene, V., Dobrovolskiene, N., Michalek, J., 2013. Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance. *Innate Immun.* 19, 98–111.
- Sueyoshi, T., Kakuta, Y., Pedersen, L.C., Wall, F.E., Pedersen, L.G., Negishi, M., 1998. A role of Lys614 in the sulfotransferase activity of human heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase. *FEBS Lett.* 433, 211–214.
- Sugahara, K., Kitagawa, H., 2000. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 518–527.
- Sugahara, K., Kitagawa, H., 2002. Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* 54, 163–175.
- Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., Kitagawa, H., 2003. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 612–620.
- Sugars, R.V., Olsson, M.-L., Marchner, S., Hulthenby, K., Wendel, M., 2013. The glycosylation profile of osteoadherin alters during endochondral bone formation. *Bone* 53, 459–467.
- Sugaya, N., Habuchi, H., Nagai, N., Ashikari-Hada, S., Kimata, K., 2008. 6-O-sulfation of heparan sulfate differentially regulates various fibroblast growth factor-dependent signalings in culture. *J. Biol. Chem.* 283, 10366–10376.
- Sun, J.C., Lanier, L.L., 2009. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur. J. Immunol.* 39, 2059–2064.
- Sun, J.C., Lanier, L.L., 2011. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8⁺ T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 645–657.
- Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., White, M.F., 1995. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173–177.
- Svensson, K.J., Kucharzewska, P., Christianson, H.C., Sköld, S., Löfstedt, T., Johansson, M.C., Mörgelin, M., Bengzon, J., Ruf, W., Belting, M., 2011. Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13147–13152.
- Swann, J.B., Smyth, M.J., 2007. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* 117, 1137–1146.
- Takeuchi, J., Sobue, M., Sato, E., Shamoto, M., Miura, K., 1976. Variation in glycosaminoglycan components of breast tumors. *Cancer Res.* 36, 2133–2139.
- Tamori, Y., Kasuga, M., 2013. Glypican-4 is a new comer of adipokines working as insulin sensitizer. *J. Diabetes Investig.* 4, 250–251.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., Lotze, M.T., 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* 249, 158–175.
- Tang, R., Rosen, S.D., 2009. Functional consequences of the subdomain organization of the sulfs. *J. Biol. Chem.* 284, 21505–21514.

- Tan, M.C.B., Goedegebuure, P.S., Belt, B.A., Flaherty, B., Sankpal, N., Gillanders, W.E., Eberlein, T.J., Hsieh, C.-S., Linehan, D.C., 2009. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 1746–1755.
- Teng, Y.H.-F., Aquino, R.S., Park, P.W., 2012. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol.* 31, 3–16.
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D.D., Carbone, D.P., Paul, W.E., Berzofsky, J.A., 2000. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol.* 1, 515–520.
- Terabe, M., Matsui, S., Park, J.-M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Chen, W., Wahl, S.M., Ledbetter, S., Pratt, B., Letterio, J.J., Paul, W.E., Berzofsky, J.A., 2003. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J. Exp. Med.* 198, 1741–1752.
- Terabe, M., Park, J.M., Berzofsky, J.A., 2004. Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 53, 79–85.
- Thacker, B.E., Xu, D., Lawrence, R., Esko, J.D., 2014. Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 35, 60–72.
- Thelin, M.A., Bartolini, B., Axelsson, J., Gustafsson, R., Tykesson, E., Pera, E., Oldberg, Å., Maccarana, M., Malmstrom, A., 2013. Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. *FEBS J.* 280, 2431–2446.
- Thelin, M.A., Svensson, K.J., Shi, X., Bagher, M., Axelsson, J., Isinger-Ekstrand, A., van Kuppevelt, T.H., Johansson, J., Nilbert, M., Zaia, J., Belting, M., Maccarana, M., Malmström, A., 2012. Dermatan sulfate is involved in the tumorigenic properties of esophagus squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 72, 1943–1952.
- Theocharis, A.D., Seidel, C., Borset, M., Dobra, K., Baykov, V., Labropoulou, V., Kanakis, I., Dalas, E., Karamanos, N.K., Sundan, A., Hjerpe, A., 2006. Serglycin Constitutively Secreted by Myeloma Plasma Cells Is a Potent Inhibitor of Bone Mineralization in Vitro. *J. Biol. Chem.* 281, 35116–35128.
- Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593.
- Thiele, H., Sakano, M., Kitagawa, H., Sugahara, K., Rajab, A., Höhne, W., Ritter, H., Leschik, G., Nürnberg, P., Mundlos, S., 2004. Loss of chondroitin 6-O-sulfotransferase-1 function results in severe human chondrodysplasia with progressive spinal involvement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10155–10160.
- Thomas, M.L., Badwe, R.A., Deshpande, R.K., Samant, U.C., Chiplunkar, S.V., 2001. Role of adhesion molecules in recruitment of Vdelta1 T cells from the peripheral blood to the tumor tissue of esophageal cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 50, 218–225.
- Thompson, L.D., Pantoliano, M.W., Springer, B.A., 1994. Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain. *Biochemistry (Mosc.)* 33, 3831–3840.
- Tiedemann, K., Olander, B., Eklund, E., Todorova, L., Bengtsson, M., Maccarana, M., Westergren-Thorsson, G., Malmström, A., 2005. Regulation of the chondroitin/dermatan fine structure by transforming growth factor-beta1 through effects on polymer-modifying enzymes. *Glycobiology* 15, 1277–1285.
- Tkachenko, E., Rhodes, J.M., Simons, M., 2005. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ. Res.* 96, 488–500.
- Tocchi, A., Parks, W.C., 2013. Functional interactions between matrix metalloproteinases and glycosaminoglycans. *FEBS J.* 280, 2332–2341.
- Todaro, M., D'Asaro, M., Caccamo, N., Iovino, F., Francipane, M.G., Meraviglia, S., Orlando, V., La Mendola, C., Gulotta, G., Salerno, A., Dieli, F., Stassi, G., 2009. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 7287–7296.
- Toker, A., Cantley, L.C., 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387, 673–676.

- Tone, Y., Pedersen, L.C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J.-I., Negishi, M., Sugahara, K., 2008. 2-o-phosphorylation of xylose and 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis. *J. Biol. Chem.* 283, 16801–16807.
- Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., Hermine, O., Roméo, P.-H., 2002. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat. Immunol.* 3, 477–482.
- Tsutsumi, K., Shimakawa, H., Kitagawa, H., Sugahara, K., 1998. Functional expression and genomic structure of human chondroitin 6-sulfotransferase. *FEBS Lett.* 441, 235–241.
- Tsutsumi, S., Yanagawa, T., Shimura, T., Fukumori, T., Hogan, V., Kuwano, H., Raz, A., 2003. Regulation of cell proliferation by autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 32165–32172.
- Tugal, D., Liao, X., Jain, M.K., 2013. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1135–1144.
- Tumova, S., Hatch, B.A., Law, D.J., Bame, K.J., 1999. Basic fibroblast growth factor does not prevent heparan sulphate proteoglycan catabolism in intact cells, but it alters the distribution of the glycosaminoglycan degradation products. *Biochem. J.* 337 (Pt 3), 471–481.
- Turnbull, J., Powell, A., Guimond, S., 2001. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol.* 11, 75–82.
- Uchida, R., Ashihara, E., Sato, K., Kimura, S., Kuroda, J., Takeuchi, M., Kawata, E., Taniguchi, K., Okamoto, M., Shimura, K., Kiyono, Y., Shimazaki, C., Taniwaki, M., Maekawa, T., 2007. Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 613–618.
- Uchimura, K., Kadomatsu, K., Nishimura, H., Muramatsu, H., Nakamura, E., Kurosawa, N., Habuchi, O., El-Fasakhany, F.M., Yoshikai, Y., Muramatsu, T., 2002. Functional analysis of the chondroitin 6-sulfotransferase gene in relation to lymphocyte subpopulations, brain development, and oversulfated chondroitin sulfates. *J. Biol. Chem.* 277, 1443–1450.
- Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z., Rosen, S.D., 2006. HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem.* 7, 2.
- Ueha, S., Shand, F.H.W., Matsushima, K., 2011. Myeloid cell population dynamics in healthy and tumor-bearing mice. *Int. Immunopharmacol.* 11, 783–788.
- Ueno, M., Yamada, S., Zako, M., Bernfield, M., Sugahara, K., 2001. Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence. *J. Biol. Chem.* 276, 29134–29140.
- Ulbricht, U., Eckerich, C., Fillbrandt, R., Westphal, M., Lamszus, K., 2006. RNA interference targeting protein tyrosine phosphatase zeta/receptor-type protein tyrosine phosphatase beta suppresses glioblastoma growth in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 98, 1497–1506.
- Urošević, M., Dummer, R., 2003. HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. *Semin. Cancer Biol.* 13, 337–342.
- Urošević, M., Dummer, R., 2008. Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting. *Cancer Res.* 68, 627–630.
- Utani, A., Nomizu, M., Matsuura, H., Kato, K., Kobayashi, T., Takeda, U., Aota, S., Nielsen, P.K., Shinkai, H., 2001. A unique sequence of the laminin alpha 3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4. *J. Biol. Chem.* 276, 28779–28788.
- Uyama, T., Ishida, M., Izumikawa, T., Trybala, E., Tufaro, F., Bergström, T., Sugahara, K., Kitagawa, H., 2006. Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates E disaccharide expression of chondroitin sulfate required for herpes simplex virus infectivity. *J. Biol. Chem.* 281, 38668–38674.
- Uyama, T., Kitagawa, H., Tanaka, J., Tamura, J., Ogawa, T., Sugahara, K., 2003. Molecular cloning and expression of a second chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* 278, 3072–3078.
- Valla, S., Li, J., Ertesvåg, H., Barbeyron, T., Lindahl, U., 2001. Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. *Biochimie* 83, 819–830.

- Van den Bossche, J., Neele, A.E., Hoeksema, M.A., de Winther, M.P.J., 2014. Macrophage polarization: the epigenetic point of view. *Curr. Opin. Lipidol.* 25, 367–373.
- Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T., 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643–1647.
- Van der Voort, R., Keehnen, R.M., Beuling, E.A., Spaargaren, M., Pals, S.T., 2000. Regulation of cytokine signaling by B cell antigen receptor and CD40-controlled expression of heparan sulfate proteoglycans. *J. Exp. Med.* 192, 1115–1124.
- Van der Voort, R., Taher, T.E., Wielenga, V.J., Spaargaren, M., Prevo, R., Smit, L., David, G., Hartmann, G., Gherardi, E., Pals, S.T., 1999. Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J. Biol. Chem.* 274, 6499–6506.
- Van Gisbergen, K.P.J.M., 2005. Dendritic Cells Recognize Tumor-Specific Glycosylation of Carcinoembryonic Antigen on Colorectal Cancer Cells through Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin. *Cancer Res.* 65, 5935–5944.
- Van Horssen, J., Wilhelmus, M.M.M., Heljasvaara, R., Pihlajaniemi, T., Wesseling, P., de Waal, R.M.W., Verbeek, M.M., 2002. Collagen XVIII: a novel heparan sulfate proteoglycan associated with vascular amyloid depositions and senile plaques in Alzheimer's disease brains. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 12, 456–462.
- Vanpouille, C., Deligny, A., Delehedde, M., Denys, A., Melchior, A., Liénard, X., Lyon, M., Mazurier, J., Fernig, D.G., Allain, F., 2007. The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-O-sulfated N-unsubstituted glucosamine residue. *J. Biol. Chem.* 282, 24416–24429.
- Veldkamp, C.T., Peterson, F.C., Pelzek, A.J., Volkman, B.F., 2005. The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 14, 1071–1081.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2011. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271.
- Vestweber, D., 2012. Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257, 184–192.
- Vetter, C.S., Groh, V., Straten, P., Spies, T., Brocker, E.-B., Becker, J.C., 2002. Expression of Stress-induced MHC Class I Related Chain Molecules on Human Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 118, 600–605.
- Vicente, C.M., Ricci, R., Nader, H.B., Toma, L., 2013. Syndecan-2 is upregulated in colorectal cancer cells through interactions with extracellular matrix produced by stromal fibroblasts. *BMC Cell Biol.* 14, 25.
- Vijayagopal, P., Figueroa, J.E., Levine, E.A., 1998. Altered composition and increased endothelial cell proliferative activity of proteoglycans isolated from breast carcinoma. *J. Surg. Oncol.* 68, 250–254.
- Vijaya Kumar, A., Salem Gassar, E., Spillmann, D., Stock, C., Sen, Y.-P., Zhang, T., Van Kuppevelt, T.H., Hülsewig, C., Koszłowski, E.O., Pavao, M.S.G., Ibrahim, S.A., Poeter, M., Rescher, U., Kiesel, L., Koduru, S., Yip, G.W., Götte, M., 2014. HS3ST2 modulates breast cancer cell invasiveness via MAP kinase- and Tcf4 (Tcf712)-dependent regulation of protease and cadherin expression. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 135, 2579–2592.
- Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jiménez, R., Chillón, M.J., Jareño, J., Zuñil, M., Callol, L., 2002. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* 35, 23–28.
- Vives, R.R., 2005. Heparan Sulfate Targets the HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120 Coreceptor Binding Site. *J. Biol. Chem.* 280, 21353–21357.
- Vivès, R.R., Lortat-Jacob, H., Fender, P., 2006. Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors : ally or foe? *Curr. Gene Ther.* 6, 35–44.
- Vivès, R.R., Seffouh, A., Lortat-Jacob, H., 2014. Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin and Yang of the Sulfs in Cancer. *Front. Oncol.* 3, 331.
- Viviano, B.L., Paine-Saunders, S., Gasiunas, N., Gallagher, J., Saunders, S., 2004. Domain-specific modification of heparan sulfate by Qsulfl modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin. *J. Biol. Chem.* 279, 5604–5611.

- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., Ugolini, S., 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331, 44–49.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., Brossay, L., 2012. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 239–252.
- Vlodavsky, I., Friedmann, Y., 2001. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 108, 341–347.
- Von Boehmer, H., 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6, 338–344.
- Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L., Nadler, L.M., 1999. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 10, 673–679.
- Wada, A., Tada, Y., Kawamura, K., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Kuriyama, T., Takenouchi, T., O-Wang, J., Tagawa, M., 2007. The effects of FasL on inflammation and tumor survival are dependent on its expression levels. *Cancer Gene Ther.* 14, 262–267.
- Wagner, L., Yang, O.O., Garcia-Zepeda, E.A., Ge, Y., Kalams, S.A., Walker, B.D., Pasternack, M.S., Luster, A.D., 1998. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 391, 908–911.
- Wang, B., Li, G.-X., Zhang, S.-G., Wang, Q., Wen, Y.-G., Tang, H.-M., Zhou, C.-Z., Xing, A.-Y., Fan, J.-W., Yan, D.-W., Qiu, G.-Q., Yu, Z.-H., Peng, Z.-H., 2011. Biglycan expression correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric cancer. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* 236, 1247–1253.
- Wang, H.-W., Joyce, J.A., 2010. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 4824–4835.
- Wang, J., Svendsen, A., Kmiecik, J., Immervoll, H., Skaftnesmo, K.O., Planagumà, J., Reed, R.K., Bjerkvig, R., Miletic, H., Enger, P.Ø., Rygh, C.B., Chekenya, M., 2011. Targeting the NG2/CSPG4 proteoglycan retards tumour growth and angiogenesis in preclinical models of GBM and melanoma. *PLoS One* 6, e23062.
- Wang, L., Brown, J.R., Varki, A., Esko, J.D., 2002. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J. Clin. Invest.* 110, 127–136.
- Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P., Esko, J.D., 2005. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 6, 902–910.
- Wang, S., Ai, X., Freeman, S.D., Pownall, M.E., Lu, Q., Kessler, D.S., Emerson, C.P., 2004. QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4833–4838.
- Wang, X., Sharp, J.S., Handel, T.M., Prestegard, J.H., 2013. Chemokine oligomerization in cell signaling and migration. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 117, 531–578.
- Watanabe, E., Maeda, N., Matsui, F., Kushima, Y., Noda, M., Oohira, A., 1995. Neuroglycan C, a Novel Membrane-spanning Chondroitin Sulfate Proteoglycan That Is Restricted to the Brain. *J. Biol. Chem.* 270, 26876–26882.
- Watanabe, N., Araki, W., Chui, D.-H., Makifuchi, T., Ihara, Y., Tabira, T., 2004. Glypican-1 as an Abeta binding HSPG in the human brain: its localization in DIG domains and possible roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1013–1015.
- Watson, N.F.S., Spendlove, I., Madjd, Z., McGilvray, R., Green, A.R., Ellis, I.O., Scholefield, J.H., Durrant, L.G., 2006. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* 118, 1445–1452.
- Webb, L.M., Ehrenguber, M.U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Rot, A., 1993. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7158–7162.
- Wegrowski, Y., Milard, A.-L., Kotlarz, G., Toulmonde, E., Maquart, F.-X., Bernard, J., 2006. Cell surface proteoglycan expression during maturation of human monocytes-derived dendritic cells and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 144, 485–493.

- Wei, G., Bai, X., Gabb, M.M., Bame, K.J., Koshy, T.I., Spear, P.G., Esko, J.D., 2000. Location of the glucuronosyltransferase domain in the heparan sulfate copolymerase EXT1 by analysis of Chinese hamster ovary cell mutants. *J. Biol. Chem.* 275, 27733–27740.
- Weiss, L., 1990. Metastatic inefficiency. *Adv. Cancer Res.* 54, 159–211.
- Weitz, J.I., 2003. Heparan sulfate: antithrombotic or not? *J. Clin. Invest.* 111, 952–954.
- Wellner, M., Herse, F., Janke, J., Gorzelniak, K., Engeli, S., Bechart, D., Lasalle, P., Luft, F.C., Sharma, A.M., 2003. Endothelial cell specific molecule-1--a newly identified protein in adipocytes. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 35, 217–221.
- Weyers, A., Yang, B., Yoon, D.S., Park, J.-H., Zhang, F., Lee, K.B., Linhardt, R.J., 2012. A Structural Analysis of Glycosaminoglycans from Lethal and Nonlethal Breast Cancer Tissues: Toward a Novel Class of Theragnostics for Personalized Medicine in Oncology? *OMICS J. Integr. Biol.* 16, 79–89.
- Whisstock, J.C., Pike, R.N., Jin, L., Skinner, R., Pei, X.Y., Carrell, R.W., Lesk, A.M., 2000. Conformational changes in serpins: II. The mechanism of activation of antithrombin by heparindagger. *J. Mol. Biol.* 301, 1287–1305.
- Whitelock, J.M., Melrose, J., Iozzo, R.V., 2008. Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 11174–11183.
- Whiteside, T.L., 2012. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin. Cancer Biol.* 22, 327–334.
- Wilczyński, J.R., Duechler, M., 2010. How do tumors actively escape from host immunosurveillance? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 58, 435–448.
- Wille, I., Rek, A., Krenn, E., Kungl, A.J., 2007. Biophysical investigation of human heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A: a mutual effect of enzyme oligomerisation and glycosaminoglycan ligand binding. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 1470–1476.
- Wilson, J., Balkwill, F., 2002. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 12, 113–120.
- Wilson, V.A., Gallagher, J.T., Merry, C.L.R., 2002. Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase (Hs2st) and mouse development. *Glycoconj. J.* 19, 347–354.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L., 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 80, 617–653.
- Wlodawer, A., Wlodaver, A., Pavlovsky, A., Gustchina, A., 1992. Crystal structure of human recombinant interleukin-4 at 2.25 Å resolution. *FEBS Lett.* 309, 59–64.
- Woods, A., Couchman, J.R., 2001. Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 578–583.
- Wu, J., Lanier, L.L., 2003. Natural killer cells and cancer. *Adv. Cancer Res.* 90, 127–156.
- Wu, R.R., Couchman, J.R., 1997. cDNA cloning of the basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan core protein, bamacan: a five domain structure including coiled-coil motifs. *J. Cell Biol.* 136, 433–444.
- Wu, Y.J., Pierre, D.P.L., Wu, J., Yee, A.J., Yang, B.B., 2005. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res.* 15, 483–494.
- Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., Condeelis, J., 2007. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 67, 2649–2656.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., Condeelis, J., 2004. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res.* 64, 7022–7029.
- Xia, G., Chen, J., Tiwari, V., Ju, W., Li, J.-P., Malmstrom, A., Shukla, D., Liu, J., 2002. Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1. *J. Biol. Chem.* 277, 37912–37919.
- Xin, H., Zhang, C., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R., Yu, H., 2009. Sunitinib Inhibition of Stat3 Induces Renal Cell Carcinoma Tumor Cell Apoptosis and Reduces Immunosuppressive Cells. *Cancer Res.* 69, 2506–2513.
- Xu, D., Moon, A.F., Song, D., Pedersen, L.C., Liu, J., 2008. Engineering sulfotransferases to modify heparan sulfate. *Nat. Chem. Biol.* 4, 200–202.

- Xu, D., Song, D., Pedersen, L.C., Liu, J., 2007. Mutational study of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase and chondroitin sulfate 2-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 282, 8356–8367.
- Yabe, T., Hata, T., He, J., Maeda, N., 2005. Developmental and regional expression of heparan sulfate sulfotransferase genes in the mouse brain. *Glycobiology* 15, 982–993.
- Yada, T., Sato, T., Kaseyama, H., Gotoh, M., Iwasaki, H., Kikuchi, N., Kwon, Y.-D., Togayachi, A., Kudo, T., Watanabe, H., Narimatsu, H., Kimata, K., 2003. Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* 278, 39711–39725.
- Yamada, T., Ohtake, S., Sato, M., Habuchi, O., 2004. Chondroitin 4-sulphotransferase-1 and chondroitin 6-sulphotransferase-1 are affected differently by uronic acid residues neighbouring the acceptor GalNAc residues. *Biochem. J.* 384, 567–575.
- Yamaguchi, Y., 2000. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 276–289.
- Yamauchi, S., Hirahara, Y., Usui, H., Takeda, Y., Hoshino, M., Fukuta, M., Kimura, J.H., Habuchi, O., 1999. Purification and characterization of chondroitin 4-sulfotransferase from the culture medium of a rat chondrosarcoma cell line. *J. Biol. Chem.* 274, 2456–2463.
- Yamauchi, S., Mita, S., Matsubara, T., Fukuta, M., Habuchi, H., Kimata, K., Habuchi, O., 2000. Molecular cloning and expression of chondroitin 4-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 275, 8975–8981.
- Yang, J., Price, M.A., Li, G.Y., Bar-Eli, M., Salgia, R., Jagadeeswaran, R., Carlson, J.H., Ferrone, S., Turley, E.A., McCarthy, J.B., 2009. Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 69, 7538–7547.
- Yang, X., Zhang, Z., Qiu, M., Hu, J., Fan, X., Wang, J., Xu, L., Yin, R., 2013. Glypican-5 is a novel metastasis suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 341, 265–273.
- Yang, Z.-Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E., Ansell, S.M., 2006. Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 66, 10145–10152.
- Yee, C., Thompson, J.A., Roche, P., Byrd, D.R., Lee, P.P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M.M., Riddell, S.R., Greenberg, P.D., 2000. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J. Exp. Med.* 192, 1637–1644.
- Yip, G.W., Smollich, M., Götte, M., 2006. Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2139–2148.
- Yiu, G.K., Kaunisto, A., Chin, Y.R., Toker, A., 2011. NFAT promotes carcinoma invasive migration through glypican-6. *Biochem. J.* 440, 157–166.
- Yoneda, A., Lendorf, M.E., Couchman, J.R., Multhaupt, H.A.B., 2012. Breast and ovarian cancers: a survey and possible roles for the cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 60, 9–21.
- Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., Gabrilovich, D.I., 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 5791–5802.
- You, W.-K., Yotsumoto, F., Sakimura, K., Adams, R.H., Stallcup, W.B., 2014. NG2 proteoglycan promotes tumor vascularization via integrin-dependent effects on pericyte function. *Angiogenesis* 17, 61–76.
- Yurchenco, P.D., 2011. Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004911–a004911.
- Zak, B.M., Crawford, B.E., Esko, J.D., 2002. Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 346–355.
- Zhang, G., Chen, S., Goldoni, S., Calder, B.W., Simpson, H.C., Owens, R.T., McQuillan, D.J., Young, M.F., Iozzo, R.V., Birk, D.E., 2009. Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan. *J. Biol. Chem.* 284, 8888–8897.
- Zhang, L., 2010. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 93, 1–17.
- Zhang, L., Beeler, D.L., Lawrence, R., Lech, M., Liu, J., Davis, J.C., Shriver, Z., Sasisekharan, R., Rosenberg, R.D., 2001a. 6-O-sulfotransferase-1 represents a critical enzyme in the anticoagulant heparan sulfate biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 42311–42321.

- Zhang, L., Lawrence, R., Schwartz, J.J., Bai, X., Wei, G., Esko, J.D., Rosenberg, R.D., 2001b. The Effect of Precursor Structures on the Action of Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase-1 and the Biosynthesis of Anticoagulant Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.* 276, 28806–28813.
- Zhang, L., Yoshida, K., Liu, J., Rosenberg, R.D., 1999. Anticoagulant Heparan Sulfate Precursor Structures in F9 Embryonal Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 5681–5691.
- Zhang, Q., Liu, L., Gong, C., Shi, H., Zeng, Y., Wang, X., Zhao, Y., Wei, Y., 2012. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS One* 7, e50946.
- Zhao, L., Tyrrell, D.L., 2013. Myeloid Dendritic Cells Can Kill T Cells During Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Viral Immunol.* 26, 25–39.
- Zhou, G., Levitsky, H.I., 2007. Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 2155–2162.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., Bluestone, J.A., 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 10, 1000–1007.
- Zhu, J.-X., Goldoni, S., Bix, G., Owens, R.T., McQuillan, D.J., Reed, C.C., Iozzo, R.V., 2005. Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis. *J. Biol. Chem.* 280, 32468–32479.
- Zhuo, L., Salustri, A., Kimata, K., 2002. A physiological function of serum proteoglycan bikunin: the chondroitin sulfate moiety plays a central role. *Glycoconj. J.* 19, 241–247.
- Zittermann, S.I., Capurro, M.I., Shi, W., Filmus, J., 2010. Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 126, 1291–1301.
- Zöller, M., 2011. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254–267.
- Zou, W., 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 295–307.
- Zygmunt, B., Veldhoen, M., 2011. T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv. Immunol.* 109, 159–196.