

N° d'ordre : 42211

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse de doctorat

présentée par

Maxime DELOS

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille 1

Discipline : Biologie moléculaire et structurale, biochimie

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Etude de la régulation d'expression et des activités des héparanes 3-O-sulfotransférases 2, 3A et 3B dans les macrophages

Soutenue le 13 Décembre 2016 devant la commission d'examen :

Président : Pr. Eric Adriaenssens (Université de Lille 1)

Rapporteurs : Dr. Sylvie Fournel-Gigleux (Université de Lorraine)
Pr. Dulce Papy-Garcia (Université Paris-Est Créteil Val de Marne)

Examineurs : Dr. Bruno Gasnier (Université Paris Descartes)
Pr. Fabrice Allain (Université de Lille 1)
Dr. Agnès Denys (Université de Lille 1)

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr. Agnès Denys dans l'Unité 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.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury :

Monsieur le Professeur Eric Adriaenssens,

Malgré vos nombreuses occupations, vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Les discussions que nous avons pu avoir lors de mes comités de suivi de thèse ont été très utiles et ont contribué à une partie de mes résultats. Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Sylvie Fournel-Gigleux,

Vous avez toujours porté un vif intérêt aux travaux menés lors de ma thèse, notamment lors de mes comités de suivi de thèse. Les discussions que nous avons eues autour de notre passion commune pour les 3-OSTs ont toutes été très utiles. Je tiens donc à vous exprimer ma profonde reconnaissance d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse, soyez assurée de mes remerciements les plus sincères.

Madame le Professeur Dulce Papy-Garcia,

C'est pour moi un réel plaisir de pouvoir vous compter parmi les membres de mon jury en qualité de rapportrice.

Monsieur le Docteur Bruno Gasnier,

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

Monsieur le Professeur Fabrice Allain,

Je vais te l'avouer : j'ai toujours voulu travailler avec toi depuis ton premier cours en Licence 2 sur les GAGs. 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 la thèse, tu as toujours été là pour m'aider à les surmonter. La confiance que tu m'as accordée au cours de ces années m'a permis d'évoluer sereinement autant sur le plan scientifique que personnel. J'ai beaucoup apprécié les années passées au sein de ton équipe et j'espère pouvoir un jour collaborer de nouveau avec toi. Pour tout ce que tu m'as apporté, je te remercie sincèrement.

Madame le Docteur Agnès Denys

Depuis mon premier jour de stage de Licence 3, tu m'as pris sous ton aile en faisant toujours preuve de bienveillance. Comme tous les étudiants qui sont passés dans l'équipe, tu m'as formé sur à peu près toutes les techniques que j'ai pu utiliser au cours de toutes ces années. J'ai beaucoup appris à tes côtés et tu m'as souvent donné de très bons conseils, ce qui m'a permis de surmonter toutes les épreuves qui se sont dressées au cours de la thèse. Ton soutien sans faille et la confiance que tu m'as portés au cours de ces années m'ont permis d'évoluer tant sur le plan scientifique que personnel. Même dans les moments les plus difficiles, tu as toujours maintenu une entière confiance en moi et je t'en remercie. Trouve en ces quelques mots mes remerciements les plus sincères et mon profond respect.

Je tiens à remercier tout particulièrement :

François,

J'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés, que ce soit pour ta rigueur, ta bonne humeur, tes nombreux conseils et ta disponibilité à toute épreuve notamment pour les analyses au confocal. Toutes nos discussions scientifiques et personnelles m'ont appris énormément et ont toujours été agréables. Trouve ici mes sincères remerciements et mon profond respect.

Mathieu,

Tu m'as toujours aidé et conseillé au cours de ma thèse et tu as répondu présent à chaque fois quand j'en avais besoin, et ce malgré tes nombreuses responsabilités. J'ai beaucoup appris en travaillant avec toi notamment en biochimie lors de notre aventure pour produire des dp 3-O-sulfatés. Ta bonne humeur, tes blagues et tes nombreux dessins ont égaillé mon quotidien et m'ont fait aussi relativiser lors des périodes plus difficiles. Je t'adresse donc mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

Charles

Alias Mr Net. J'ai beaucoup apprécié les moments passés ensemble que se soit au Laboratoire ou en dehors, notamment cette année en tête à tête dans le bureau, nos discussions diverses et variées ainsi que nos nombreuses « théories fumeuses ». Tu as pris le relais de l'étude sur les 3-OSTs, je te souhaite bon courage pour mener à bien ce projet dans le monde énigmatique des sulfostransférases. Connaissant tes capacités scientifiques et ta motivation, je suis persuadé que tu arriveras au terme de ton projet sans soucis. Enfin, je tiens à te remercier pour l'aide que tu m'as apporté au cours de cette année.

Pierre

Alias Pierrot des bois. Tu m'as légué l'étude de la polarisation des macrophages sur un plateau, j'espère en avoir fait bon usage. J'ai beaucoup apprécié tous les moments passés dans le bureau, au Labo ou lors des différentes soirées passées ensemble. Je te remercie grandement pour tous les conseils prodigués lors de ces années. Je te souhaite bonne continuation dans tes projets professionnels et personnels.

Anne-Sophie

Alias Anne-soso des bois. J'ai beaucoup apprécié les moments passés ensemble que se soit au Laboratoire ou lors des différentes soirées. Ta bonne humeur a su égailler le quotidien de l'équipe durant ces années. Je te remercie également pour tous les conseils, notamment lors de mon arrivée. Je te souhaite bonne continuation dans tes projets professionnels et personnels.

L'équipe du 020

Je remercie tout le labo 020 pour leur accueil et leur bonne humeur quotidienne, en particulier Sven, Dorothee, Sandrine et Anne-Marie pour leur disponibilité et leurs nombreux conseils. J'ai également beaucoup apprécié les moments passés ensemble que ce soit au Laboratoire, notamment lors de nos pauses cafés ou lors des soirées passées ensemble.

Patricia et Chrystelle

Quelle chance d'avoir des voisines comme vous ! Je tiens à vous remercier pour votre gentillesse et votre serviabilité à toute épreuve à mon égard. Les discussions (scientifiques ou non) que nous pu avoir ont toujours été très agréables. Patricia, un grand merci pour tous les conseils en BM et nos nouveaux bureaux.

Les étudiants et ex-étudiants de l'UGSF

Je remercie tous les étudiants que j'ai pu croisé au sein de l'UGSF ou en dehors et qui ont contribué à la bonne ambiance qui règne dans ce bâtiment: je pense notamment à Agata, Marie, Florent, Steffi, Cindy, Clément et Clément, Thomas, Pierre-André, Maxence, Jorick et Sébastien ainsi que tous ceux que j'ai oublié et qui je l'espère ne m'en tiendront pas rigueur.

Tous les membres de l'UGSF,

Je remercie toutes les personnes dont j'ai croisé la route durant ces 3 dernières années au C9, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail à travers nos discussions scientifiques ou non d'ailleurs...

D'une manière plus personnelle, je tiens à remercier :

Eudoxie,

Bah non je ne t'ai pas oubliée....Tu as été là dans les bons moments, ceux passés à rigoler, à se raconter nos vies et j'en passe. Et tu as également été là dans les mauvais moments, une écoute, une aide et un soutien, ce qui m'a souvent été d'un grand réconfort et je t'en remercie. Grâce à tous ces moments partagés tu es devenu une amie, qui je l'espère le restera pour longtemps. Je te souhaite bon courage dans la dernière ligne droite et surtout restes comme tu es, c'est le plus important. Une pensée particulière pour Ludovic, ton compagnon de toujours.

Mes amis,

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui m'ont soutenu au cours de ces années de thèse : je pense notamment à Grégory, Laura, Elodie, Nicolas, Guillaume B et Guillaume G et bien d'autres, qui se reconnaîtront.

Ma famille,

Je remercie tous les membres de ma famille pour m'avoir soutenu lors de ces trois années: une pensée particulière pour Nicole, Francine, Michèle, Gilbert, Delphine, Philippe, Alexandre et Karine. Une pensée particulière pour Mémé, qui ne verra pas l'aboutissement de ce travail.

Mes frères,

Wilfried, Vincent, je n'ai jamais eu vraiment l'occasion de vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi depuis maintenant 27 ans. Vous m'avez toujours encouragé tout au long de ces années, et c'est pour moi très rassurant de se sentir soutenu et accompagné au quotidien. Sans nul doute que je ne serai pas la aujourd'hui sans vous. Trouvez en ces quelques mots mes sincères remerciements et toute mon affection. Une pensée toute particulière pour Sébastien, Abby sans oublier Mikhaïl.

Mes parents,

Maman, Papa, je tiens à vous remercier infiniment pour tout le soutien que vous m'avez apporté aux cours de ces années. Vous m'avez toujours aidé, encouragé et soutenu, cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans vous. Vous m'avez donné toutes les chances pour réussir et je vous en serai éternellement reconnaissant. Trouvez ici mes remerciements les plus profonds et toute mon affection.

Lucie,

Ces derniers remerciements ont pour moi une valeur très particulière. Tu m'as supporté durant ces trois dernières années et je sais que ça n'a pas toujours été facile, surtout en période de rédaction. A la fois source de motivation, de réconfort, de soutien et de bonheur, tu m'apportes énormément depuis maintenant 3 ans. Je ne saurai trouver les mots justes pour te remercier comme tu le mérites. Tu es une personne formidable, j'ai vraiment beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés. Une petite dédicace pour la petite Canelle, j'ai failli l'oublier.

Résumé

Les héparanes sulfates (HS) sont des polysaccharides linéaires retrouvés à la surface de nombreux types cellulaires et dans la matrice extracellulaire. Ils sont formés par la répétition d'unités disaccharidiques composées d'un acide uronique lié à un résidu de glucosamine, pouvant être sulfatées en différentes positions. Ces modifications se font de manière séquentielle et coordonnée par plusieurs familles de sulfotransférases dont l'expression varie en fonction du type cellulaire et de l'environnement. Par exemple, la famille des 3-O-sulfotransférases regroupe sept isoenzymes, qui possèdent des spécificités de substrat. Ces différentes modifications confèrent aux HS une large diversité structurale, ce qui leur permet d'interagir avec de nombreux ligands protéiques dont ils modulent la biodisponibilité. Ainsi, les HS sont impliqués dans la régulation de nombreux processus physiopathologiques.

La fixation de l'herpès simplex virus 1 (HSV-1) sur ses cellules cibles fait intervenir des interactions entre des glycoprotéines de l'enveloppe virale et des molécules présentes à la surface de la cellule hôte. La fixation du virus est suivie de l'étape de fusion membranaire, qui nécessite l'intervention de la glycoprotéine gD. Cette protéine peut interagir avec quatre récepteurs différents selon le type de cellule cible : HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), les nectines-1 et -2 des motifs HS contenant une glucosamine 3-O-sulfatée. En plus des mécanismes de fusion membranaire nécessaires à l'entrée du virus, la protéine gD est également impliquée dans la protection des cellules cibles contre l'apoptose. Dans ce contexte, la première partie de la thèse a consisté à étudier l'implication des héparanes 3-O-sulfatés dans les réponses induites par la protéine gD dans les macrophages. Nos données montrent que les réponses anti-apoptotiques induites par la protéine gD nécessitent la coopération entre HVEM et les héparanes 3-O-sulfatés.

Selon l'environnement inflammatoire, les macrophages peuvent subir deux types d'activation, caractérisés par des phénotypes et des fonctions distinctes. En présence de cytokines Th1 et d'agonistes des TLRs (*Toll Like Receptors*), 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. Ils sont connus pour leur rôle dans les processus de résolution de l'inflammation et de réparation tissulaire. De précédents travaux ont montré que la polarisation des macrophages affecte l'expression des HS sulfotransférases. Dans les macrophages M1, le taux d'expression de la 3-OST3B est augmenté alors que celui de la 3-OST2 est fortement réduit. A l'inverse, la polarisation M2 ne réduit le niveau d'expression d'aucune enzyme, mais induit une augmentation de l'expression de la 3-OST2. Nous avons donc étudié les mécanismes moléculaires à l'origine de ces variations d'expression. Nous avons ainsi montré, lors de la polarisation M1, que la 3-OST3B est régulée de manière transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. En revanche, le taux de transcrits de la 3-OST2 chute brutalement par l'action d'un microARN.

Finalement, la dernière partie de la thèse a porté sur la localisation subcellulaire des 3-OSTs. Les HS sulfotransférases sont considérées comme étant des enzymes golgiennes. Cependant, la localisation subcellulaire des 3-OSTs n'a jamais été déterminée expérimentalement. Nos résultats montrent que la 3-OST3B est strictement localisée dans l'appareil de Golgi alors que les 3-OST2 et 3-OST3A sont retrouvées au niveau de la membrane plasmique. La 3-OST3A co-localise à la surface cellulaire avec le syndécan-4 tandis que la 3-OST2 est associée au syndécan-2. L'étude suggère une fonction spécifique pour chaque 3-OST afin de générer des héparanes 3-O-sulfatés avec des propriétés distinctes.

Summary

Heparan sulfates (HS) are linear polysaccharides found at the cell surface and in the extracellular matrix. They are formed by the repetition of disaccharide units, which are formed by the linkage of glucuronic acid to glucosamine and are sulfated at different positions of both residues. During the step of maturation, HS are subjected to sequential and coordinated actions of several enzymes, for which the expression varies depending on cell type and cellular environment. All of the modifications confer a broad structural diversity in HS, which allows them to interact with a number of binding ligands, for which they modulate the activities and bioavailability. Consequently, HS are involved in the regulation of many physiological and/or pathological processes. The last step of HS maturation involved 3-O-sulfotransferases (3-OSTs). This modification is rare and can be catalyzed by seven isoenzymes, which exhibit fine differences in substrate specificity. However, little is known about the regulatory mechanisms controlling the expression and functions of these isoenzymes.

Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) is capable of targeting cells via interactions between glycoproteins of the viral envelope and receptors present at the host cell surface. Following binding of the virion, the next step of HSV-1 infection is a membrane fusion process, which is mediated by the glycoprotein gD. This protein can interact with four receptors depending on the target cells: HVEM, nectin-1 and -2 and/or 3-O-sulfated HS. In addition to the fusion process, gD is capable of protecting host cells against apoptosis. In this context, the first part of the thesis was to study the participation of 3-O-sulfated HS in the responses triggered by the glycoprotein gD in macrophages. Our results showed that gD induces the activation of anti-apoptotic pathways and protects macrophages against apoptosis by a mechanism dependent on the cooperation between HVEM and 3-O-sulfated HS.

Depending on the immune environment, macrophages can undergo either proinflammatory or alternative phenotypes, termed M1 or M2 respectively. A previous study from our Laboratory has showed that macrophage polarization alters the expression of HS-sulfotransferases, especially that of 3-OSTs. While 3-OST2 is highly expressed in M2 macrophages, it is replaced by 3-OST3B in M1 macrophages. Based on these results, we investigated the molecular mechanisms underlying changes in the expression of both isoenzymes in M1 macrophages. We demonstrated that induction of the expression of 3-OST3B is regulated at the transcriptional and post-transcriptional levels. Conversely, M1 polarization induces a strong reduction in the level of 3-OST2 transcripts, which appears dependent on a rapid arrest of gene transcription and to be associated with the action of microRNA.

Finally, the last part of the thesis focused on the subcellular localization of 3-OSTs. HS sulfotransferases are considered as Golgi-resident enzymes. However, the subcellular localization of 3-OSTs has not yet been confirmed by experimental approaches. Our results demonstrated that 3-OST3B is strictly localized in the Golgi apparatus, while 3-OST2 and 3-OST3A are also present at the plasma membrane but do not co-localize in the same areas. In addition, we showed that 3-OST3A was associated with syndecan-4, while 3-OST2 co-localized with syndecan-2. Our results suggest that these three isoenzymes are localized in different cellular compartments, which suggests that they may be involved in the generation of 3-O-sulfated HS with distinct properties.

Abréviations

| | |
|--|--|
| 2-OST: 2-O-sulfotransférase | HSV-1: Herpes Simplex Virus 1 |
| 3-OST: 3-O-sulfotransférase | HVEM: <i>Herpes Virus Entry Mediator</i> |
| 6-OST: 6-O-sulfotransférase | IdoUA: Acide iduronique |
| AH: Acide Hyaluronique | IFN-γ: Interféron γ |
| Bcl : <i>B-cell Lymphoma</i> | IL: Interleukine |
| BMP: <i>Bone Morphogenetic Protein</i> | JNK: <i>c-Jun N-terminal protein kinase</i> |
| AT-III: Antithrombine III | KS: Kératane Sulfate |
| CS: Chondroïtane Sulfate | LPS: Lipopolysaccharide |
| CyPB: Cyclophiline B | MAPK: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> |
| DS: Dermatine Sulfate | M-CSF: <i>Macrophage-Colony Stimulating factor</i> |
| Erk: <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> | MEC : Matrice Extracellulaire |
| EXT: <i>Exostosin glycosyltransferase</i> | NDST: <i>N-déacétylase/N-sulfotransférase</i> |
| EXTL: <i>Exostosin glycosyltransferase like</i> | NF-κB: Nuclear Factor- κ B |
| FGF: <i>Fibroblast Growth Factor</i> | PAPS: Phospho-adénosyl phosphosulfate |
| GAG: Glycosaminoglycane | PI3-K: Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase |
| Gal: Galactose | RT-PCR: <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> |
| gD: glycoprotéine D | siRNA: <i>small-interfering RNA</i> |
| GlcNAc: <i>N-acétyl glucosamine</i> | STAT: <i>Signal Transducer and Activation of Transcription</i> |
| GlcUA: Acide glucuronique | Sulf: 6-O-endosulfatase |
| GlcN: Glucosamine | TGF-β: <i>Transforming Growth Factor</i> |
| HBP: <i>Heparin Binding Protein</i> | TLR: <i>Toll-Like Receptors</i> |
| HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase | TNF-α: <i>Tumor Necrosis Factor α</i> |
| HS: Héparane Sulfate | UTR: <i>Untranslated Region</i> |
| HS2ST: Héparane Sulfate 2-O-sulfotransférase | VEGF: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| HS3ST: Héparane Sulfate 3-O-sulfotransférase | Xyl: Xylose |
| HS6ST: Héparane Sulfate 6-O-sulfotransférase | |

Tables des matières

| | |
|--|----|
| Avant Propos | 1 |
| Généralités | 4 |
| Partie 1: les Glycosaminoglycanes | 4 |
| 1. L'acide hyaluronique | 4 |
| 2. Les chondroïtanes/dermatanes sulfates | 5 |
| 3. L'héparine et les héparanes sulfates | 7 |
| 4. Les kératanes sulfates | 9 |
| Partie 2: Biosynthèse des héparanes sulfates | 11 |
| 1. Etape d'initiation | 11 |
| 2. Etape d'élongation | 12 |
| 2.1 Les EXTs | 12 |
| 2.2 Les EXTLs | 14 |
| 3. Etape de maturation | 15 |
| 3.1 Les N-déacétylases / N-sulfotransférases | 16 |
| 3.2 La C5-épimérase | 20 |
| 3.3 La 2-O-sulfotransférase | 23 |
| 3.4 Les 6-O-sulfotransférases | 25 |
| 3.5 Les 3-O-sulfotransférases | 28 |
| 3.6 Les 6-O-endosulfatases | 33 |
| Partie 3: Fonctions associées à la 3-O-sulfatation des HS | 37 |
| 1. Fonctions physiologiques associées à la 3-O-sulfatation | 37 |
| 1.1. Rôle des héparanes 3-O-sulfatés dans l'activité de l'antithrombine-III | 37 |
| 1.2. Rôle de la 3-O-sulfatation dans l'activité de la cyclophiline B | 40 |
| 1.3. Rôle de la 3-O-sulfatation dans le développement | 41 |
| 2. Fonctions pathologiques associées à la 3-O-sulfatation | 44 |
| 2.1. Implication de la 3-O-sulfatation dans l'infection par HSV-1 | 44 |
| 2.2. Implication de la 3-O-sulfatation dans les processus cancéreux | 46 |
| 2.3 Implication de la 3-O-sulfatation dans la maladie d'Alzheimer | 48 |
| Travaux personnels | 50 |
| Partie 1: Participation des héparanes 3-O-sulfatés dans les propriétés anti-apoptotiques de la glycoprotéine gD du virus HSV-1 et de la cyclophiline B | 50 |
| 1. Introduction | 50 |
| 1.1. Généralités sur HSV-1 | 50 |
| 1.2. Processus apoptotiques liés à HSV-1 | 51 |
| 1.2.1 Généralités sur l'apoptose | 51 |
| 1.2.2 Réponses anti-apoptotiques induites par HSV-1 | 52 |

| | |
|--|-----|
| 2. Travaux de recherche | 54 |
| 3. Publication..... | 55 |
| 4. Discussion | 82 |
| Partie 2: Etude des variations d'expression des 3-OST2 et 3-OST3B dans les monocytes/macrophages | 86 |
| 1. Les macrophages: acteurs importants de la réponse immunitaire..... | 86 |
| 1.1 La polarisation des macrophages | 86 |
| 1.2 Mécanismes moléculaires régulant la polarisation des macrophages..... | 87 |
| 1.3 Régulation des voies métaboliques des macrophages M1/M2 | 89 |
| 2. Travaux de recherche | 90 |
| 3. Résultats | 91 |
| 3.1 Expression des 3-OSTs de type gD dans les macrophages M1/M2 | 91 |
| 3.2 Régulation de l'expression de la 3-OST3B dans les monocytes/ macrophages par des stimuli pro-inflammatoires | 92 |
| 3.2.1 <i>Cinétique d'expression de la 3-OST3B dans les monocytes/macrophages</i> | 92 |
| 3.2.2 <i>Voies de signalisation impliquées dans l'induction de la 3-OST3B</i> | 93 |
| 3.2.3 <i>Régulation transcriptionnelle du gène Hs3st3B1</i> | 95 |
| 3.2.4 <i>Régulation post-transcriptionnelle du gène Hs3st3B1</i> | 97 |
| 3.3 Régulation de l'expression de la 3-OST2 au cours de la polarisation M1 des macrophages. | 97 |
| 3.3.1 <i>Cinétique d'expression de la 3-OST2 au cours de la polarisation M1</i> | 97 |
| 3.3.2 <i>Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de la 3-OST2</i> | 98 |
| 3.3.3 <i>Effet des stimuli de polarisation M1 sur la transcription et la stabilité de l'ARNm codant pour la 3-OST2</i> | 99 |
| 4. Discussion | 102 |
| Partie 3: Etude de la localisation subcellulaire des 3-OSTs | 107 |
| 1. Introduction..... | 107 |
| 2. Travaux de recherche | 108 |
| 3. Publication..... | 109 |
| 4. Discussion | 133 |
| Conclusion générale | 137 |
| Bibliographie | 143 |
| Annexes | 165 |

Avant propos

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS/Université de Lille, dans l'Equipe « Diversité des héparanes sulfates et réponse inflammatoire » dirigée par le Pr. Fabrice Allain. Il a été dirigé par le Dr. Agnès Denys.

Les héparanes sulfates (HS) sont des polysaccharides appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. Ils sont présents à la surface des cellules et dans les matrices extracellulaires, où ils interagissent avec de nombreuses protéines, telles que des facteurs de croissance, des cytokines et des protéines virales. *Via* ces interactions, ils modulent la biodisponibilité d'un large répertoire de médiateurs extracellulaires et sont donc impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques normaux ou pathologiques. La spécificité d'interaction entre les HS et leurs ligands est liée à une importante hétérogénéité de motifs structuraux, dont l'origine dépend d'un système de biosynthèse finement régulé.

Les HS sont synthétisés sous la forme d'un précurseur non sulfaté formé de la répétition d'une unité disaccharidique composée d'un acide glucuronique (GlcUA) lié à une glucosamine *N*-acétylée (GlcNAc). Plusieurs familles d'enzymes de maturation vont ensuite agir de façon successive sur ce précurseur. Dans un premier temps, les *N*-déacétylases/*N*-sulfotransférases (NDSTs) vont catalyser la sulfatation des groupements aminés des résidus de GlcNAc. Cette modification est suivie de l'intervention de la C5 épimérase sur les résidus de GlcUA, et de la 2-*O*-sulfatation de certains résidus de IdoUA et plus rarement de GlcUA, catalysée par la 2-*O*-sulfotransférase (2-OST). Finalement, les ajouts de groupements sulfates sur les fonctions hydroxyles en C6 et plus rarement en C3 des résidus de GlcN sont catalysés par les 6-*O*-sulfotransférases (6-OSTs) et 3-*O*-sulfotransférases (3-OSTs), respectivement. Les enzymes qui agissent sur les glucosamines sont représentées par plusieurs membres. Chez l'Homme, quatre NDSTs, trois 6-OSTs et sept 3-OSTs ont ainsi été identifiées. Ces isoenzymes n'agissent pas de façon systématique le long de la chaîne HS et présentent des différences au niveau de leur spécificité de substrat. De plus, leur expression est très variable en fonction du type cellulaire et des conditions physiologiques, ce qui explique pourquoi les chaînes HS formées présentent une large diversité structurale. Toutefois, les mécanismes à l'origine des variations d'expression et d'activité de ces enzymes de maturation des HS sont encore mal connus.

La fixation du virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1) sur ses cellules cibles fait intervenir des interactions entre des glycoprotéines de l'enveloppe virale et des molécules présentes à la surface de la cellule hôte. La fixation du virus est suivie de l'étape de fusion membranaire, qui nécessite l'intervention de la glycoprotéine gD. Cette protéine peut interagir avec quatre récepteurs différents selon le type de cellule cible : HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), les nectines-1 et -2 et des motifs HS contenant une glucosamine 3-*O*-sulfatée. En plus des mécanismes de fusion membranaire nécessaires à l'entrée du virus, la protéine gD est également impliquée dans la protection des cellules cibles contre l'apoptose.

Dans ce contexte, la première partie de la thèse à consister à étudier l'implication des héparanes 3-O-sulfatés dans les réponses induites par la protéine gD dans les macrophages. Nos données montrent que les réponses anti-apoptotiques induites par la protéine gD nécessitent la coopération entre HVEM et les héparanes 3-O-sulfatés.

Selon l'environnement inflammatoire, les macrophages peuvent subir deux types d'activation, caractérisés par des phénotypes et des fonctions distinctes. En présence de cytokines Th1 et d'agonistes des TLRs (*Toll Like Receptors*), 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. Ces derniers sont connus pour leur rôle dans les processus de résolution de l'inflammation et de réparation tissulaire. Des travaux précédents réalisés au Laboratoire ont montré que la polarisation des macrophages affecte l'expression des enzymes de maturation des HS. Ainsi, le niveau d'expression de la 3-OST3B est fortement augmenté dans les macrophages M1, alors que la 3-OST2 n'est quasi plus exprimée. A l'inverse, la polarisation M2 n'a pas d'effet répresseur, mais induit une augmentation de l'expression de la 3-OST2. Sur la base de ces résultats, la deuxième partie de la thèse a été consacrée à l'étude des mécanismes moléculaires à l'origine des variations d'expression des deux isoenzymes lors de la polarisation M1. Nous avons montré que l'activation des macrophages par des facteurs pro-M1 régule l'expression différentielle de la 3-OST3B et de la 3-OST2 par des voies distinctes, en agissant dans les deux cas *via* des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels.

Finalement, la dernière partie de la thèse a porté sur la localisation subcellulaire des 3-OSTs par une approche en microscopie de fluorescence. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr. François Foulquier à l'UGSF. Si les HS sulfotransférases sont considérées comme étant des enzymes golgiennes, la localisation précise des 3-OSTs n'a jamais été déterminée expérimentalement. Nos résultats montrent que la 3-OST3B est strictement localisée dans l'appareil de Golgi. Par contre, les 3-OST2 et 3-OST3A ont une répartition plus large, puisqu'elles sont retrouvées jusqu'à la membrane plasmique. En outre, nous avons pu mettre en évidence que les localisations inattendues de la 3-OST3A et de la 3-OST2 sont associées à l'expression respective du syndécan-4 et du syndécan-2 dans les mêmes compartiments. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que la localisation subcellulaire spécifique de chaque 3-OST combinée à leur expression différentielle dans les sous-types de macrophages pourrait être à l'origine de la synthèse de motifs HS 3-O-sulfatés avec des propriétés distinctes.

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

Publications

- Martinez P., Denys A., **Delos M.**, Sikora A.S., Carpentier M., Julien S., Pestel J. and Allain F. (2015). « Differential macrophage polarization alters the expression profile of glycosaminoglycans ». *Glycobiology* ; 25(5) : 502-513.
- Sikora A.S., **Delos M.**, Martinez P., Carpentier M., Allain F. and Denys A. (2016). « Regulation of the expression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by inflammatory stimuli in human monocytes ». *J. Cell. Biochem.* ; 117(7) : 1529-1542.
- Sikora A.S., Hellec C., Carpentier M., Martinez P., **Delos M.**, Denys A. and Allain F. (2016). « Tumour-necrosis factor- α induces heparan sulfate 6-O-endosulfatase 1 (Sulf-1) expression in fibroblasts ». *Int. J. Biochem. Cell Biol.* ; 80 : 57-65.
- Delos M.**, Hellec C., Foulquier F., Carpentier M., Allain F. and Denys A. « Participation of 3-O-sulfated heparan sulfates in the protection of macrophages by herpes simplex virus-1 glycoprotein D and cyclophilin B against apoptosis ». Accepté dans *FEBS Open Bio*.

Communications orales

- Martinez P., Denys A., **Delos M.**, Sikora A.S., Carpentier M., Julien S., Pestel J. and Allain F. "Differential macrophage polarization alters the expression profile of glycosaminoglycans". 25th Joint Glycobiology Meeting, 14-16 septembre 2014. Gand, Belgique.
- Delos M.**, Foulquier F., Carpentier M., Allain F. and Denys A. "Insights into molecular trafficking of 3-O sulfotransferases 2, 3A and 3B". 26th Joint Glycobiology Meeting, 26-27 octobre 2015. Lille, France.

Communications par affiche

- Delos M.**, Carpentier M., Allain F. and Denys A. "Importance des héparanes 3-O-sulfatés dans les réponses induites par la protéine gD du virus HSV-1". 25^{ème} journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG 2014), 12-15 mai 2014. Paris, France.
- Delos M.**, Carpentier M., Allain F. and Denys A. "Importance of 3-O sulfated heparan sulfates in the responses induced by HSV-1 gD". 25th Joint Glycobiology Meeting, 14-16 septembre 2014. Gand, Belgique.
- Delos M.**, Foulquier F., Allain F. and Denys A. "Subcellular localization of heparan 3-OST2, 3A and 3B". 26^{ème} journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG 2016), 23-27 mai 2016. Aussois, France.
- Hellec C., Denys A., **Delos M.**, Carpentier M. and Allain F. "Role of heparan sulfate 3-O-sulfotransferases in cancer cell proliferation and survival". 26^{ème} journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG 2016), 23-27 mai 2016. Aussois, France.
- Hellec C., Denys A., **Delos M.**, Carpentier M. and Allain F. "Pro-tumoral activity of 3-O-sulfotransferases". Journée scientifique de l'ITMO AVIESAN : « 100 years of Heparin : the success story of a carbohydrate », 10 octobre 2016. Paris, France.

Généralités

Partie 1: les Glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polysaccharides linéaires constitués de la répétition d'unités disaccharidiques constituées d'un acide uronique : acide D-glucuronique (GlcUA) ou L-iduronique (IdoUA), lié soit à une héxosamine : D-glucosamine (GlcN) ou D-galactosamine (GalN), soit à un D-galactose (Gal). Les GAGs ont été classés en quatre familles selon la nature de leur unité disaccharidique : l'acide hyaluronique (AH), les chondroïtanes/dermatanes sulfates (CS/DS), l'héparine et les héparanes sulfates (HS) et les kératanes sulfates (KS). La diversité structurale des GAGs est accentuée par de possibles substitutions. En effet, la fonction amine de l'héxosamine peut être acétylée ou sulfatée et les fonctions hydroxyles en position C2 de l'acide uronique et en position C3, C4 et/ou C6 de l'héxosamine peuvent être sulfatées. Ces différentes modifications et la présence des acides uroniques confèrent aux GAGs un caractère fortement anionique. Hormis l'AH, les GAGs sont liés par covalence à des protéines pour former les protéoglycanes.

1. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique fut isolé pour la première fois dans les années 1930 dans l'humeur vitrée de l'œil par Meyer et Palmer (1934). Toutefois, sa structure précise ne fut déterminée que dans les années 1950 (Weissman and Meyer, 1952). Il est composé de la répétition d'une unité disaccharidique formée d'un acide D-glucuronique relié par une liaison β 1-3 à un résidu de *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc). Ces différentes unités dissaccharidiques sont reliées entre elles par une liaison β 1-4 (Figure 1). Les polymères ainsi synthétisés peuvent compter jusqu'à 25000 unités récurrentes et atteindre une taille comprise entre 10^4 et 10^7 Da.

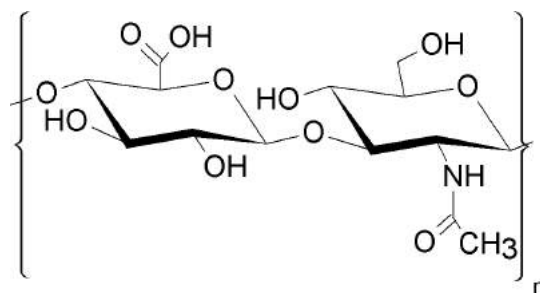


Figure 1 : Structure de l'unité disaccharidique de l'acide hyaluronique. Le nombre moyen de disaccharides (n) est compris entre 3000 et 25000.

A l'inverse des autres GAGs, l'AH n'est ni modifié ni associé à un « core » protéique pour former un protéoglycane. De plus, sa synthèse diffère des autres GAGs puisqu'elle n'est pas localisée dans l'appareil de Golgi mais à la face interne de la membrane plasmique. Elle fait intervenir la famille des hyaluronate synthases qui compte à ce jour trois

membres (HAS1, HAS2 et HAS3). Ces isoenzymes polymérisent l'AH en ajoutant successivement un résidu de GlcUA puis un résidu de GlcNAc. Le polymère néosynthétisé est ensuite sécrété dans le milieu extracellulaire. Ces enzymes de biosynthèse possèdent une répartition tissulaire différente et peuvent s'associer en homo ou hétérodimères, contrôlant ainsi leur capacité à générer des chaînes de taille variables (Bart *et al.*, 2015).

L'AH est un des composants majoritaires des matrices extracellulaires (MEC), bien que certaines études lui attribuent une localisation intracellulaire et à la surface cellulaire. Il est notamment retrouvé dans les tissus conjonctifs (humeur vitrée, liquide synovial), au niveau de l'épiderme et dans le cerveau. Ce polymère est associé à de nombreuses fonctions. Il possède un caractère fortement anionique et polaire, ce qui en fait un acteur essentiel dans le maintien de l'hydratation et de la turgescence des tissus. Il est également impliqué dans la formation et l'architecture des MEC, notamment grâce à ses interactions avec le domaine G1 de protéoglycanes extracellulaires de la famille des hyalectanes (Nusgens, 2010). Les édifices formés vont s'insérer dans le réseau de fibres de collagène, assurant ainsi les propriétés mécaniques nécessaires au fonctionnement des tissus. Outre ces propriétés biomécaniques, l'AH a été décrit comme un régulateur de nombreux processus biologiques *via* ses interactions avec des récepteurs membranaires comme le CD44 et des protéines de la famille des « hyaladérines », par exemple RHAMM (*Hyaluronan-Mediated Mobility Receptor*). L'interaction entre l'AH et ses différents partenaires engendre l'activation de cascades de signalisation cellulaire, impliquant par exemple les voies MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), le NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) ou les petites protéines G, lui conférant ainsi un rôle modulateur dans les phénomènes de prolifération, migration et adhérence cellulaires mais aussi dans l'embryogenèse et l'inflammation. L'AH est aussi impliqué dans les processus invasifs liés au cancer et dans certaines pathologies inflammatoires (Lee and Spicer, 2000; Puré and Assoian, 2009).

2. Les chondroïtanes/dermatanes sulfates

L'unité disaccharidique de base des CS/DS est composée d'un acide uronique lié en 1-3 à un résidu de GalNAc. Les CS et DS se différencient selon la nature de l'acide uronique. En effet, un résidu de GlcUA est exclusivement retrouvé au sein des chaînes CS tandis que des résidus d'IdoUA peuvent être retrouvés au sein des chaînes DS. Cette modification est réalisée par deux C5-épimerases, nommées DS-epi1 et DS-epi2 (Malmström *et al.*, 2012). Les CS/DS sont reliés à certains résidus de sérine appartenant au « core » protéique par un tétrasaccharide de liaison de structure GlcUA-Gal-Gal-Xyl-O-Ser, formant ainsi les protéoglycanes à chaînes chondroïtanes et dermatanes sulfates (CSPGs et DSPGs respectivement) (Mikami and Kitagawa, 2013; Iozzo and Schaefer, 2015).

La biosynthèse des chaînes CS/DS est un processus complexe et finement régulé. L'étape de polymérisation des chaînes se déroule dans l'appareil de Golgi et nécessite l'intervention de six glycosyltransférases. Elles ont été nommées en fonction de leur activité *in vitro*. On retrouve les ChSy-1, -2 et -3 (*Chondroitin synthase-1, -2 et -3*), le ChPF (*Chondroitin polymerizing factor*) et les ChGn-1 et -2 (*Chondroitin GalNAc transferase-1 et -2*). Leurs séquences protéiques sont proches puisqu'elles partagent au moins 40% d'homologie de séquence au niveau du domaine catalytique. Les trois ChSy possèdent les deux activités glycosyltransférases permettant d'ajouter successivement des résidus de GlcUA et GalNAc. Toutefois, leur seule présence ne suffit pas pour induire la polymérisation de la chaîne et leurs activités enzymatiques sont fortement augmentées en présence du ChPF, conduisant ainsi à la formation d'un polysaccharide précurseur. Les deux dernières enzymes, ChGn-1 et -2, possèdent la capacité d'ajouter le premier résidu de GalNAc sur le tétrasaccharide de liaison. Elles sont donc indispensables à l'initiation de la polymérisation des chaînes. De plus, elles semblent être impliquées dans l'élongation et dans la régulation de la taille des chaînes (Mikami and Kitagawa, 2013).

Les chaînes CS/DS vont ensuite être sulfatées sur différentes positions (Figure 2). A ce jour, huit sulfotransférases ont été identifiées et vont pouvoir modifier les unités O et iO, représentant les structures non-modifiées des CS et DS respectivement. Dans le cas des CS, l'ajout de groupements sulfates en position 4 ou 6 des résidus de GalNAc par les C4STs (C4ST1, 2 et 3) et les C6ST (C6ST1 et 2) conduit à la formation des unités A et C respectivement. L'unité A peut à son tour être 6-O-sulfatée par l'intervention de la GalNAc4S-6ST (GalNAc 4 sulfate 6-O-sulfotransférase), appelée aussi CHST15 (*Carbohydrate synthase 15*), formant ainsi l'unité E. Quant à l'unité C, l'ajout d'un groupement sulfate en position 2 de l'acide uronique par l'UST (Uronyl 2-O-sulfotransférase) conduit à la formation de l'unité D. Dans le cas des DS, l'unité iO ne va subir qu'une seule sulfatation en position 4 de la GalNAc. Elle est réalisée par la D4ST (Dermatane 4-O-sulfotransférase) pour donner naissance à l'unité iA. L'existence d'une 6-O-sulfotransférase modifiant les chaînes DS n'a pas encore été démontrée, bien qu'une telle activité ait été détectée dans le sérum de veau fœtal (Nadanaka *et al.*, 1999). L'unité iA va pouvoir être 6-O-sulfatée par la GalNAc4S-6S ou 2-O-sulfatée par l'UST pour créer les unités iE et iB respectivement.

L'ensemble de ces modifications ne se fait pas de manière systématique au sein des chaînes CS/DS. En effet, l'expression spatio-temporelle variable des enzymes de biosynthèse ainsi que les différences de longueur de chaîne observées engendrent une grande hétérogénéité structurale et donnent naissance à des structures potentiellement uniques dans chaque type cellulaire. Ces caractéristiques confèrent à ces molécules la possibilité d'interagir avec un large panel de ligands protéiques, ce qui explique que les

chaines CS/DS sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que l'architecture des MEC, la cicatrisation, le développement et la plasticité des neurones et l'ostéogénèse. Ils sont également retrouvés au sein de complexes de signalisation cellulaire et permettent la fixation d'agents pathogènes (Malmström *et al.*, 2012; Mikami and Kitagawa, 2013; Dyck and Karimi-Abdolrezaee, 2015).

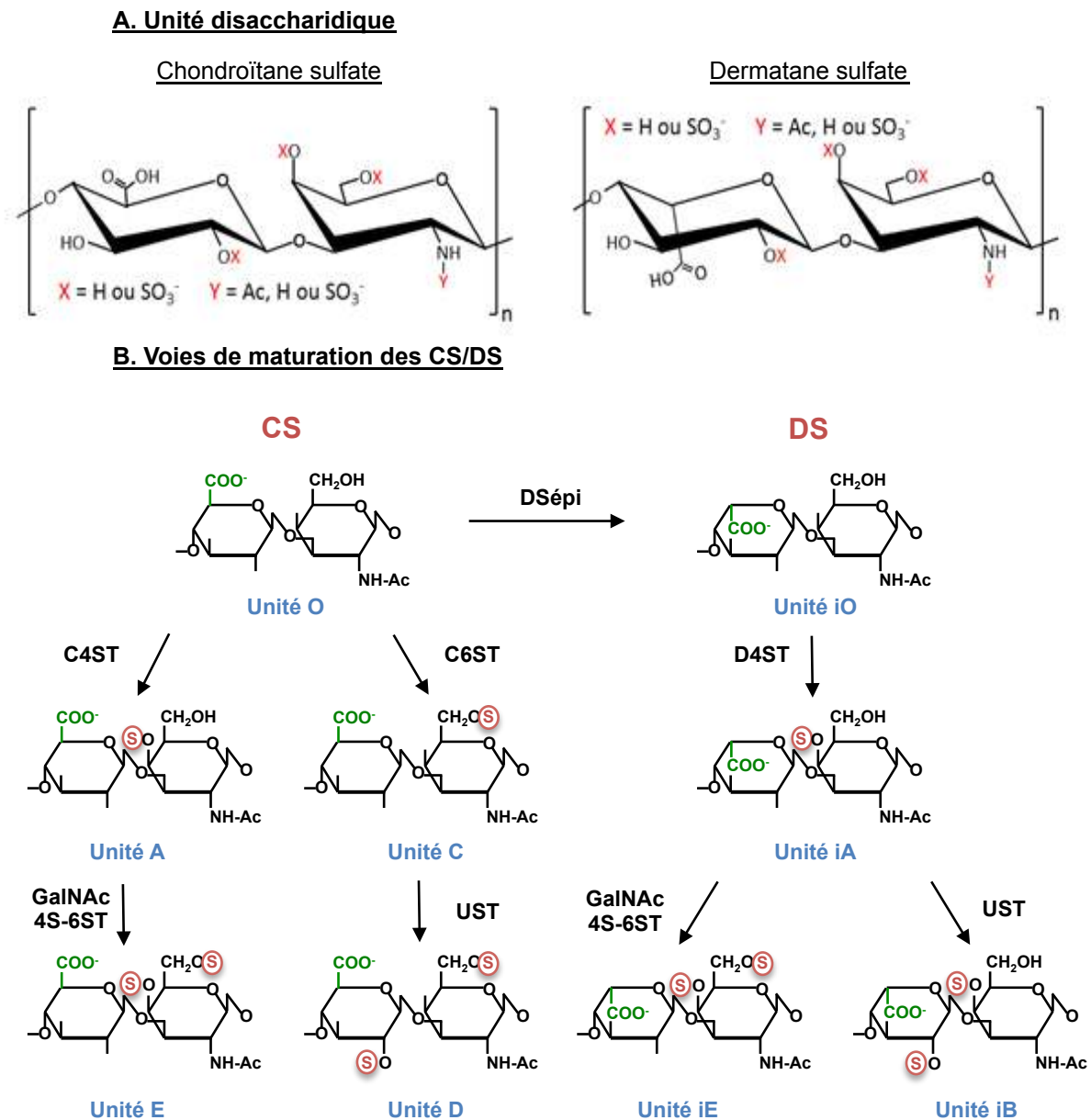


Figure 2 : Structure des chondroïtanes/dermatanes sulfates. (A) Structures des unités disaccharidiques des CS/DS. Le nombre moyen de disaccharides (n) est compris entre 5 et 60 pour les CS et DS. **(B)** Schéma des voies de maturation des CS/DS. D'après Sugahara *et al.*, 2003; Mikami and Kitagawa, 2013.

3. L'héparine et les héparanes sulfates

L'héparine est composée de la répétition d'unités disaccharidiques formées par un acide uronique, qui est dans la plupart des cas un IdoUA, lié par des liaisons 1-4 à un résidu

de GlcN qui peut être sulfaté au niveau de la fonction amine, en position C6 et ponctuellement en position C3. Quant au résidu d'IdoUA, il est majoritairement 2-O-sulfaté. Initialement identifiés comme des sous-produits obtenus lors de la purification de l'héparine, les héparanes sulfates partagent avec cette dernière le même disaccharide de base, à savoir un acide uronique, qui est en majorité un GlcUA, lié en 1-4 à un résidu de GlcN. Les résidus d'acide uronique peuvent être 2-O sulfatés et les résidus de GlcN peuvent être 6-O-sulfatés et/ou plus rarement 3-O-sulfatés (Figure 3A). Quant à la fonction amine, elle peut être *N*-acétylée, *N*-sulfatée et plus rarement non substituée. Combinées entre elles, l'ensemble de ces modifications (*N*- et *O*-sulfatation, épimerisation) permettrait de générer 48 motifs disaccharidiques différents. Toutefois, seulement 24 d'entre eux ont été identifiés chez l'Homme, probablement à cause des restrictions engendrées par la machinerie de biosynthèse des HS (Esko and Lindahl, 2001; Shriver *et al.*, 2012). L'héparine est un polysaccharide possédant un haut degré de sulfatation réparti de façon homogène au sein de la chaîne. A l'inverse, le degré de sulfatation est variable au sein des chaînes HS résultant à l'organisation de ces chaînes en différents domaines. En effet, on constate une alternance de domaines fortement sulfatés, appelés domaines NS (*N*-sulfatés) ou « domaines S » et de domaines faiblement sulfatés ou non, appelés domaines NA (*N*-acétylés). Des domaines à degré de sulfatation variables, appelés domaines NA/NS ou « zones de transition » (TZ) sont intercalés entre les domaines NA et NS (Figure 3B) (Esko and Lindahl, 2001; Esko and Selleck, 2002).

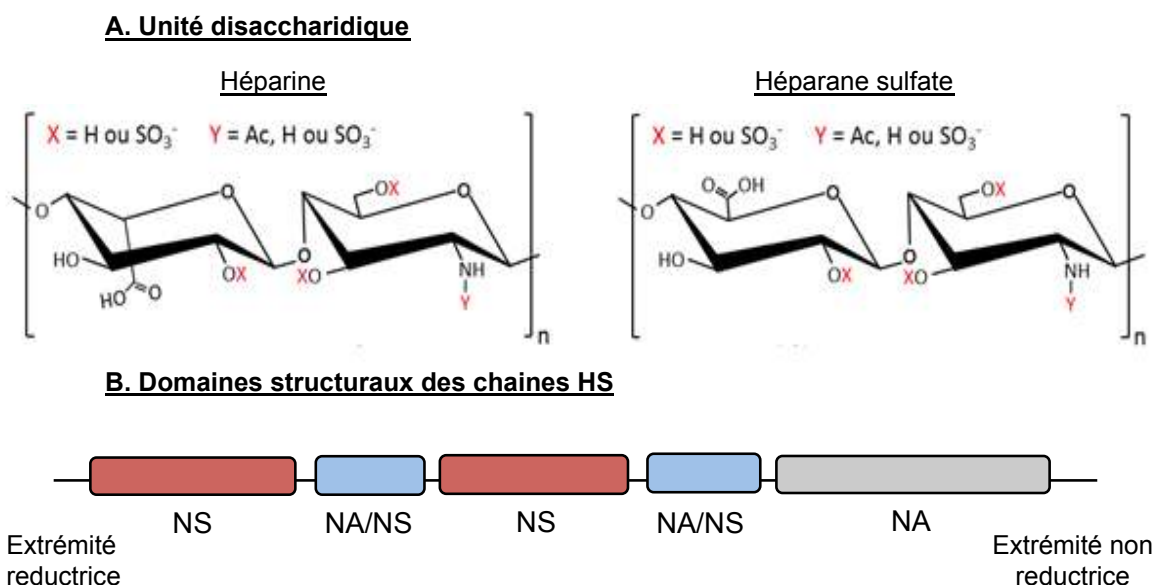


Figure 3 : Structure de l'héparine et des héparanes sulfates. (A) Structures des unités disaccharidiques de l'héparine et des HS. Le nombre moyen de disaccharides (*n*) est compris entre 20 et 80 pour l'héparine et entre 30 et 100 pour les HS. **(B)** Représentation schématique des différents domaines structuraux (NS, NA et NA/NS) au sein des chaînes HS. D'après Esko and Selleck, 2002.

La synthèse de l'héparine se déroule exclusivement dans les mastocytes tandis que les HS sont synthétisés et exprimés à la surface de la plupart des cellules et dans les MEC. L'héparine et les HS sont reliés à leur « core » protéique par le même tétrasaccharide de liaison que les CS/DS, à partir duquel seront ajoutés successivement les résidus de GlcN et GlcUA, formant ainsi les PG à chaînes héparanes sulfates (HSPGs).

Les étapes de biosynthèse et de maturation des HS sont des processus extrêmement complexes et finement régulés faisant intervenir un grand nombre de glycosyltransférases, sulfotransférases et une épimérase (voir Partie 2), expliquant ainsi l'hétérogénéité structurale observée. L'héparine est connue de tous pour ses propriétés anticoagulantes, *via* son interaction avec l'antithrombine-III, un inhibiteur de la coagulation (voir Partie 3). Les HS interviennent dans un grand nombre de processus biologiques (prolifération, adhérence et migration cellulaires, inflammation...) grâce à leurs capacités d'interaction avec un large panel de ligands protéiques (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance).

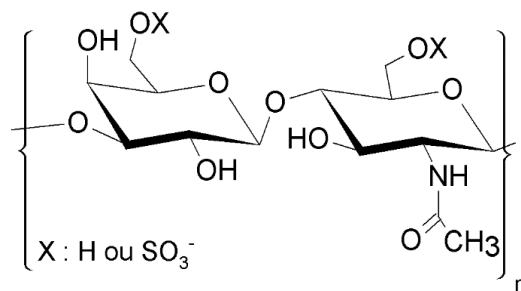
4. Les kératanes sulfates

Les kératanes sulfates ont été isolés pour la première fois dans les années 1930 par Suzuki (1939) au niveau de la cornée puis caractérisés dans la peau par Meyer *et al.*, (1953), d'où le terme « kératane ». Toutefois, ils sont également retrouvés au niveau des MEC des cartilages ainsi qu'aux niveaux cérébral, osseux et dans d'autres tissus. Leur structure se distingue des autres GAGs par l'absence d'acide uronique. Elle est en effet composée d'une répétition de *N*-acétyl-lactosamine [D-Galactose (β 1-4) GlcNAc] liées entre elles par des liaisons β 1-3 (Figure 4). Les KS sont regroupés au sein de 3 classes selon leur mode de liaison au « core » protéique, formant ainsi les protéoglycanes à chaîne KS (KSPGs). Les KS isolés de la cornée, appelés KS-I, se lient à un résidu d'asparagine par une liaison *N*-glycosidique. La deuxième classe, appelée KS-II, est principalement retrouvée dans les cartilages. Les KS-II sont liés *via* une liaison de type O-glycane à un résidu de sérine. Un troisième type de liaison reliant un résidu de mannose à une sérine, définit les KS-III. Ils sont principalement présents au niveau cérébral (Figure 4) (Funderburgh, 2000; Quantock *et al.*, 2010).

La biosynthèse des KS se déroule dans l'appareil de Golgi et fait intervenir plusieurs glycosyltransférases, mais toutes n'ont pas encore été identifiées. Les enzymes assurant les liaisons au « core » protéique interviennent également dans la biosynthèse des *N*- et O-glycanes. Les chaînes KS sont ensuite polymérisées par ajout successif de résidus de Gal et de GlcNAc sur l'oligosaccharide naissant. A ce jour, plusieurs β 1-4 galactosyltransférases (β 4GalT) ont été identifiées, notamment les β 4Gal-T1 et -T4 (Ujita *et al.*, 2000). En revanche, les données concernant la ou les enzymes responsables du transfert du résidu de GlcNAc, les β -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransférases (β 3GlcNAcT) restent vagues. Bien que plusieurs

β 3GlcNAcT aient été décrites, seule l'iGnT permet la synthèse du polylectosamine, en association avec la β 4Gal-T1. Les KS présentent une grande hétérogénéité de taille et de densité de sulfatation. Les deux résidus de l'unité disaccharidique des KS peuvent être sulfatés en position C6. Cette modification fait intervenir la KS-Gal6ST (Kéراتane sulfate galactosyl 6-O-sulfotransférase) et la GlcNAc6ST (*N*-acétylglucosaminyl 6-O-sulfotransférase), qui transfèrent le sulfate en position C6 des résidus de Gal et GlcNAc respectivement. De plus, les chaînes KS peuvent parfois être fucosylées au niveau du premier résidu de GlcNAc et sialylées au niveau de l'extrémité terminale non réductrice. (Funderburgh, 2002; Pomin, 2015)

A. Unité disaccharidique



B. Oligosaccharides de liaison

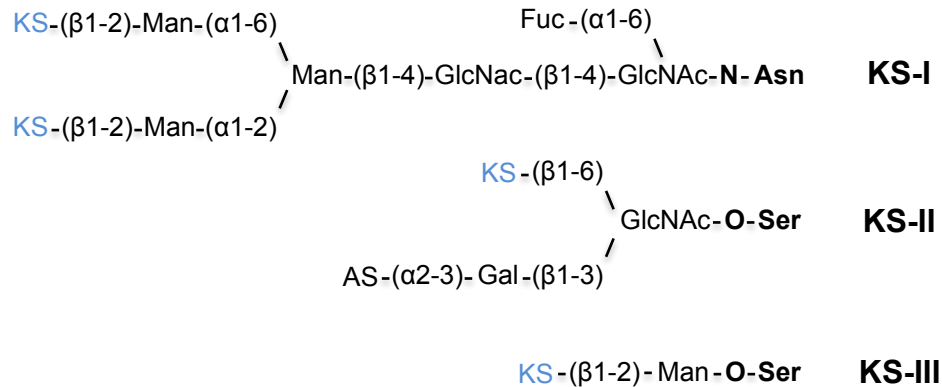


Figure 4 : Structure des kéراتanes sulfates. (A) Structure de l'unité disaccharidique des KS. La répétition moyenne d'unités disaccharidiques (n) est inférieure à 30. **(B)** Structure des différents oligosaccharides de liaison des KS. Modifié d'après Funderburgh, 2002 ; Pomin, 2015.

Les KS demeurent des composants importants dans le maintien des propriétés d'hydratation de la cornée et du cartilage. Dans la cornée, ils conservent la transparence des tissus, nécessaire pour assurer la vision et participent à la résolution de l'inflammation en modulant le gradient de chimiokines impliqué dans le recrutement des neutrophiles. Dans le cartilage, ils permettent de résister aux contraintes physiques associées à sa fonction (Carlson *et al.*, 2010; Quantock *et al.*, 2010).

Partie 2: Biosynthèse des héparanes sulfates

La biosynthèse des HS est un processus hautement complexe et finement régulé qui se déroule principalement dans l'appareil de Golgi, qui peut être décomposé en trois étapes principales : une première étape d'initiation où la formation d'un motif tétrasaccharidique de liaison et permet l'attachement au « core » protéique des protéoglycanes. Cette étape est suivie de l'étape d'élongation qui résulte en la formation d'une chaîne HS immature par incorporation successive de résidus GlcNAc et GlcUA. Enfin, l'étape de maturation englobe plusieurs réactions de modifications, comprenant une épimérisation et des réactions de sulfatation en différentes positions des résidus de GlcNAc et GlcUA.

1. Etape d'initiation

Comme pour les CS/DS, la biosynthèse des chaînes HS est initiée par la formation d'un noyau tétrasaccharidique : $\text{GlcUA}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Xyl}$, permettant l'attachement du polysaccharide sur le « core » protéique des protéoglycanes. Cette liaison se fait généralement au niveau de résidu de sérine au sein de séquences de type Ser-Gly. Toutefois, elle peut occasionnellement avoir lieu sur des résidus de thréonine (Brinkmann *et al.*, 1997). Le processus débute par l'action des xylosyltransférases-I ou -II (XylT-I, XylT-II), qui ajoute un résidu de xylose à partir du donneur UDP-Xyl sur la fonction hydroxyle de l'acide aminé accepteur. Après ajout successif de deux résidus de Gal par les galactosyltransférases-I et -II ($\beta 4\text{GalT7}$ et $\beta 3\text{GalT6}$, respectivement) à partir de l'UDP-Gal, le dernier résidu, provenant du substrat donneur UDP-GlcUA, est ajouté par la glucuronyltransférase-I (B3GAT3) (Figure 5). Toutes les enzymes intervenant au cours de ce processus sont des protéines transmembranaires de type II localisées dans l'appareil de Golgi (Schön *et al.*, 2006).

Le noyau tétrasaccharidique peut être modifié au niveau de plusieurs résidus. En effet, le résidu de Xyl peut être phosphorylé en position C2 par la kinase FAM20B. Cette modification est commune aux HS et CS/DS et augmenterait la synthèse des chaînes HS et CS. En effet, la surexpression de FAM20B en cellules HeLa entraîne une augmentation du taux de chaînes HS et CS alors que son invalidation a les effets inverses. Toutefois, les auteurs montrent que la taille des chaînes reste inchangée (Ueno *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2009). La phosphorylation du résidu de Xyl influence l'activité des autres glycosyltransférases. En effet, des études ont démontré que la présence d'un résidu de xylose phosphorylé inhibe le transfert du premier résidu de Gal par la $\beta 4\text{GalT7}$ et à l'inverse favorise le transfert du deuxième résidu de Gal et du résidu de GlcUA par la B3GAT3 et $\beta 3\text{GalT6}$ respectivement. Par conséquent, la phosphorylation du résidu devrait avoir lieu

juste après l'ajout du premier résidu de Gal (Gulberti *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2014). De plus, les travaux de Koike *et al.* (2014) ont montré que la déphosphorylation du résidu de Xyl coïncide avec l'ajout du résidu de GlcUA. En effet, les auteurs ont identifié une 2-phosphoxylose phosphatase, dénommée XYLP, qui serait capable de former un complexe hétérodimérique avec la B3GAT3, augmentant ainsi leurs activités respectives.

Les deux résidus de Gal peuvent également être sulfatés : le premier en position 6 et le deuxième en position 4. Une étude montre que la 4-O-sulfatation du deuxième résidu de Gal est retrouvée uniquement au niveau des chaînes CS (Ueno *et al.*, 2001; Gulberti *et al.*, 2005). L'ensemble de ces résultats suggère que les modifications des différents résidus du noyau tétrasaccharidique seraient des régulateurs essentiels à la fois de la biosynthèse des GAGs mais aussi du choix du type de GAG polymérisé.

2. Etape d'élongation

Après la synthèse du noyau tétrasaccharidique, un résidu de GlcNAc est ajouté sur le résidu de GlcUA par une liaison $\alpha 1-4$. Une fois ce premier résidu ajouté, l'élongation des chaînes HS se poursuit par addition séquentielle de résidus de GlcUA par une liaison $\beta 1-4$ et de résidus de GlcNAc en $\alpha 1-4$. Ces réactions sont catalysées par différentes glycosyl transférases de la famille EXTs (*Exostosin glycosyltransferase*) et EXTLs (*Exostosin-like glycosyltransferase*). Les mécanismes à l'origine du processus de terminaison demeurent à ce jour peu connus (Figure 5).

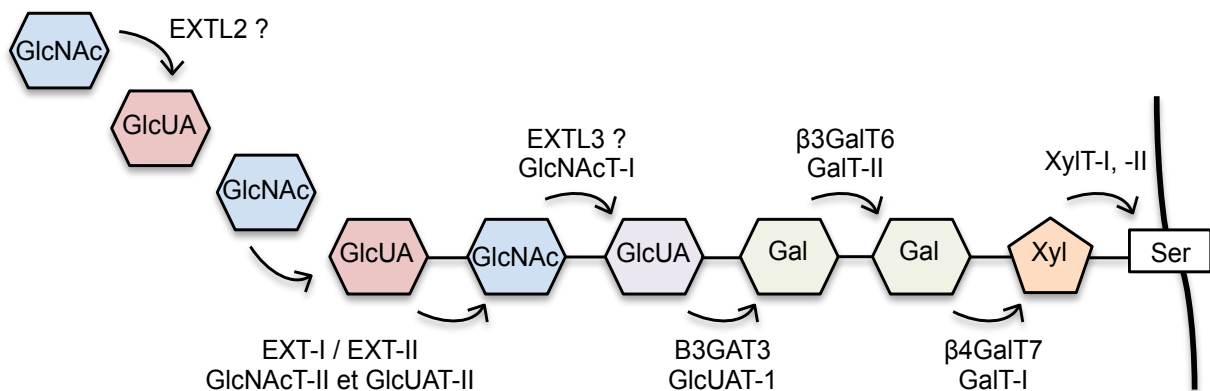


Figure 5 : Biosynthèse du noyau tétrasaccharidique et étape d'élongation des chaînes HS. D'après Buse-Wicher *et al.*, 2014

2.1 Les EXTs

Chez les Mammifères, la famille des EXTs compte deux membres (EXT1 et EXT2) qui sont exprimés de manière ubiquitaire dans l'organisme. Ces deux enzymes sont codées par deux gènes distincts, nommés *EXT1* et *EXT2*, qui produisent respectivement des protéines de 746 et 718 acides aminés. EXT1 et EXT2 sont des protéines

transmembranaires de type II avec un court domaine cytoplasmique au niveau de l'extrémité Nt suivi d'un domaine transmembranaire de 17 acides aminés et d'un domaine globulaire Ct. Plusieurs domaines sont conservés au niveau des séquences protéiques, parmi lesquels on retrouve des motifs DXD participant à la fixation des nucléotides sucres et donc indispensables à l'activité glycosyltransférase. EXT1 et EXT2 partagent également des séquences riches en cystéines dont l'espacement est conservé, suggérant ainsi une conformation structurale similaire.

Les deux enzymes ont été décrites pour être associées au sein de l'appareil de Golgi, et leur dimérisation est nécessaire pour exercer leur activité de polymérisation (Kobayashi *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2000). EXT1 possède les deux activités β 4GlcUAT (GlcUA-TII) et α 4GlcNAcT (GlcNAc-TII). En effet, les cellules CHOpgD dépourvues de EXT1 sont incapables de synthétiser des chaînes HS et ne possèdent plus aucune des deux activités de biosynthèse (Wei *et al.*, 2000). En outre, les travaux de Senay *et al.* (2000) ont montré qu'une forme recombinante de EXT1 possède les deux activités de polymérisation *in vitro* et que l'enzyme peut à elle seule assurer la polymérisation des chaînes HS. Le site catalytique de EXT1 portant l'activité GlcUA-TII a été localisé dans la région Nt de la protéine par des études de mutagenèse (McCormick *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000). En revanche, le site portant l'activité GlcNAc-TII n'a pas encore été clairement identifié, mais il ne semble pas être localisé dans la même région. Comme pour EXT1, EXT2 possède les deux activités de polymérisation *in vitro*. L'identification des domaines catalytiques reste à ce jour inconnue. De façon surprenante, les deux enzymes n'ont pas d'activité redondante, bien qu'elles possèdent les mêmes activités enzymatiques. En effet, la seule présence d'EXT2 est insuffisante pour induire la polymérisation des chaînes HS, puisque sa transfection dans des cellules déficientes en EXT1 ne restaure pas la synthèse du polymère. De même, sa surexpression n'entraîne pas d'augmentation significative des activités enzymatiques (Lind *et al.*, 1998; McCormick *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000). Il a également été démontré que EXT2 interagit avec la NDST1, première enzyme intervenant dans la maturation des chaînes HS. Les auteurs suggèrent que EXT2 serait importante pour positionner la NDST1 au niveau de l'extrémité non-réductrice de la chaîne, afin qu'elle puisse y exercer son activité (Presto *et al.*, 2008).

A ce jour, peu d'études ont porté sur la régulation de l'expression de EXT1 et EXT2. Les travaux de Jennes *et al.* (2012) ont récemment identifié et caractérisé le promoteur fonctionnel de EXT1. Ces auteurs ont également démontré qu'un SNP (*single nucleotide polymorphism*) module la fixation du facteur de transcription USF1 (*Upstream stimulatory factor 1*) et pourrait être impliqué dans le développement des ostéosarcomes multiples. Plus récemment, une autre étude a montré qu'une mutation du gène codant pour EXT2 participerait également au développement de la maladie (Musso *et al.*, 2015).

2.2 Les EXTLs

La famille des EXTLs est représentée par trois membres (EXTL1, EXTL2 et EXTL3) exprimés de manière ubiquitaire. Ce sont respectivement des protéines de 676 AA, 330 AA et 919 AA, qui présentent une forte homologie de séquence avec les protéines de la famille EXT. *In vitro*, EXTL1 et EXTL3 possèdent une activité *N*-acétylglucosaminyl-transférase (Kim *et al.*, 2013). Bien que EXTL2 possède cette activité, elle est également capable de transférer des résidus de GalNAc. Une fois le résidu de GalNAc ajouté, les autres enzymes de biosynthèse des HS sont alors incapables d'exercer leur activité (Kitagawa *et al.*, 1999). EXTL2 est le seul membre de la famille dont la structure tridimensionnelle a été résolue. La réaction enzymatique se produit *via* un mécanisme de rétention du substrat donneur. Les auteurs suggèrent, sur la base de leur homologie de séquences, que les autres membres des familles EXT/ EXTL possèderaient le même mécanisme d'action (Pedersen *et al.*, 2003).

De nombreux points restent à éclaircir concernant le rôle précis des EXTLs. Certaines études suggèrent que EXTL1 participerait à l'étape d'élongation de la chaîne HS (Kim *et al.*, 2001; Busse *et al.*, 2007). Concernant EXTL2, les travaux de Nadanaka *et al.* (2013) ont démontré que l'enzyme est capable d'ajouter un résidu de GlcNAc sur le tétrasaccharide possédant un résidu de Xyl phosphorylé, et que la structure ainsi formée n'est plus un substrat pour les autres enzymes de biosynthèse. De plus, l'inactivation d'expression de EXTL2 entraîne une augmentation de la taille des chaînes HS produites, qui n'est pas dû à des variations d'expression des autres enzymes de biosynthèse (Katta *et al.*, 2015). Ainsi, ces résultats suggèrent que EXTL2 serait plutôt impliquée dans le processus de terminaison de la biosynthèse des chaînes HS. Finalement, EXTL3 a été décrite comme une enzyme capable de transférer un résidu de GlcNAc aussi bien sur le noyau tétrasaccharidique (GlcNAc-TI) que sur le polymère en cours de synthèse (GlcNAc-TII). De plus, son activité de transfert est supérieure à celle des autres EXTL (Kim *et al.*, 2001). En revanche, son inactivation entraîne la synthèse de chaînes HS de longueur plus importante. Les auteurs suggèrent que l'inactivation de EXTL3 induirait un défaut de l'étape d'initiation de la synthèse des HS, et par conséquent une diminution du nombre de chaînes. Ce mécanisme entraînerait alors une plus grande élongation des chaînes restantes (Busse *et al.*, 2007). Takahashi *et al.* (2009) ont démontré que les souris déficientes pour EXTL3 ne synthétisent plus aucune chaîne HS, ce qui renforce l'hypothèse du rôle de cette enzyme dans le processus d'initiation de l'élongation des chaînes HS par son activité GlcNAc-TI. De plus, les auteurs ont montré que les souris invalidées pour EXTL3 présentent un défaut de sécrétion de l'insuline. Toutefois, les relations entre l'enzyme et les conséquences physiologiques ne sont pas encore définies.

3. Etape de maturation

La dernière étape de biosynthèse des chaînes HS correspond au processus de maturation, au cours duquel s'effectue toute une série de modifications réalisées de façon séquentielle et coordonnée par de nombreuses enzymes. Ainsi, la maturation des chaînes HS est un processus complexe et finement régulé, qui peut être séparé en cinq étapes : une réaction de *N*-déacétylation le plus souvent suivie d'une réaction de *N*-sulfatation des résidus de GlcNAc catalysée par les *N*-déacétylases/*N*-sulfotransférases (NDSTs) ; l'épimérisation de certains résidus de GlcUA en résidus d'IdoUA par la C5-épimérase ; la 2-*O*-sulfatation de certains résidus de IdoUA et plus rarement de GlcUA catalysée par la 2-*O*-sulfotransférase (2-OST) ; finalement, les ajouts de groupements sulfates sur les fonctions hydroxyles en C6 et plus rarement en C3 des résidus de GlcN, réactions faisant intervenir les 6-*O*-sulfotransférases (6-OSTs) et 3-*O*-sulfotransférases (3-OSTs), respectivement (Figure 6).

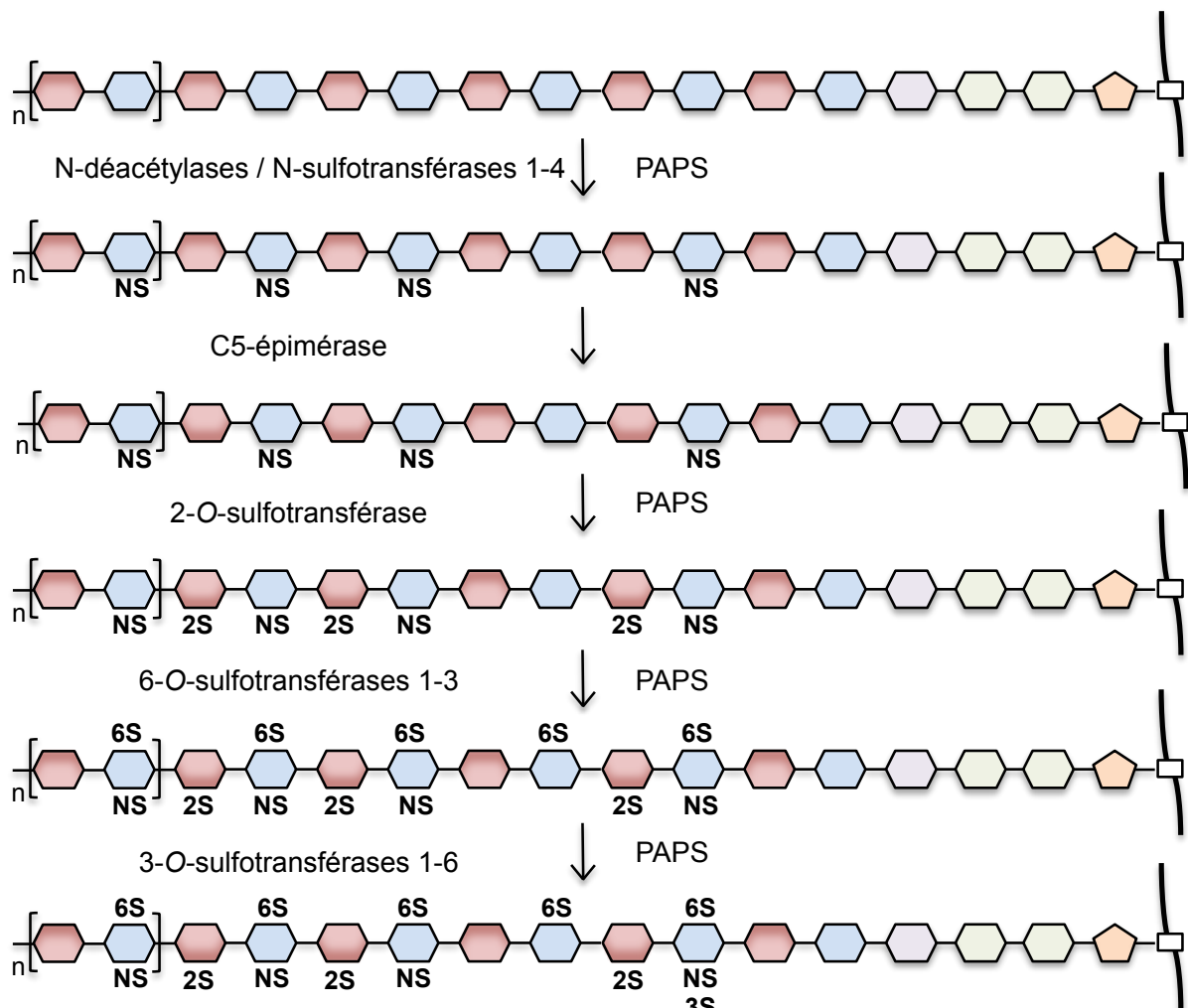


Figure 6 : Etape de maturation des chaînes HS. Représentation schématique de l'enchaînement des modifications réalisées par les enzymes de maturation.

3.1 Les *N*-déacétylases / *N*-sulfotransférases

Le processus de maturation des chaînes HS est initié par l'action des NDSTs. Cette première étape est considérée comme une des étapes les plus importantes de la maturation des HS. En effet, étant donné le caractère séquentiel du processus de maturation, l'action des NDSTs va grandement influencer l'action de l'ensemble des enzymes suivantes et par conséquent, le degré de modification de la chaîne HS. De par sa position en amont des autres réactions de modification, la réaction de *N*-déacétylation/*N*-sulfatation des GlcNAc va donc contribuer à définir l'organisation des différents domaines le long de la chaîne.

Chez les Vertébrés, quatre membres de la famille des NDSTs codées par des gènes distincts ont été identifiés à ce jour. Ce sont des protéines transmembranaires de type II, constituées d'un court domaine cytoplasmique et d'un domaine globulaire Ct portant les deux activités catalytiques (Tableau 1). L'analyse des séquences protéiques montre que les quatre NDSTs présentent une forte homologie de séquences. En effet, la NDST1 possède 70% et 86% d'homologie avec la NDST2 et NDST3, respectivement. La NDST2 présente 82% de similarité avec la NDST3. Enfin, la NDST4 présente 70, 67 et 81% d'homologie de séquence avec les NDST1, NDST2 et NDST3, respectivement (Figure 7).

Tableau 1 : Caractéristiques des *N*-déacétylases / *N*-sulfotransférases humaines

| Gène | | | | |
|--------------|----------------------------|--|------------------|-------------------------------|
| | Localisation chromosomique | Taille du cDNA | | Taille de la séquence codante |
| <i>NDST1</i> | 5q33.1 | 8030 pb | | 2648 pb |
| <i>NDST2</i> | 10q22 | 4006 pb | | 2651 pb |
| <i>NDST3</i> | 4q26 | 5961 pb | | 2621 pb |
| <i>NDST4</i> | 4q25-q26 | 3341 pb | | 2618 pb |
| Protéine | | | | |
| | Nombre d'acides aminés | Nombre d'acides aminés des différents domaines | | |
| | | Cytoplasmique | Transmembranaire | Catalytique |
| <i>NDST1</i> | 882 | 18 | 21 | 815 |
| <i>NDST2</i> | 883 | 18 | 21 | 816 |
| <i>NDST3</i> | 873 | 13 | 20 | 811 |
| <i>NDST4</i> | 872 | 13 | 20 | 810 |

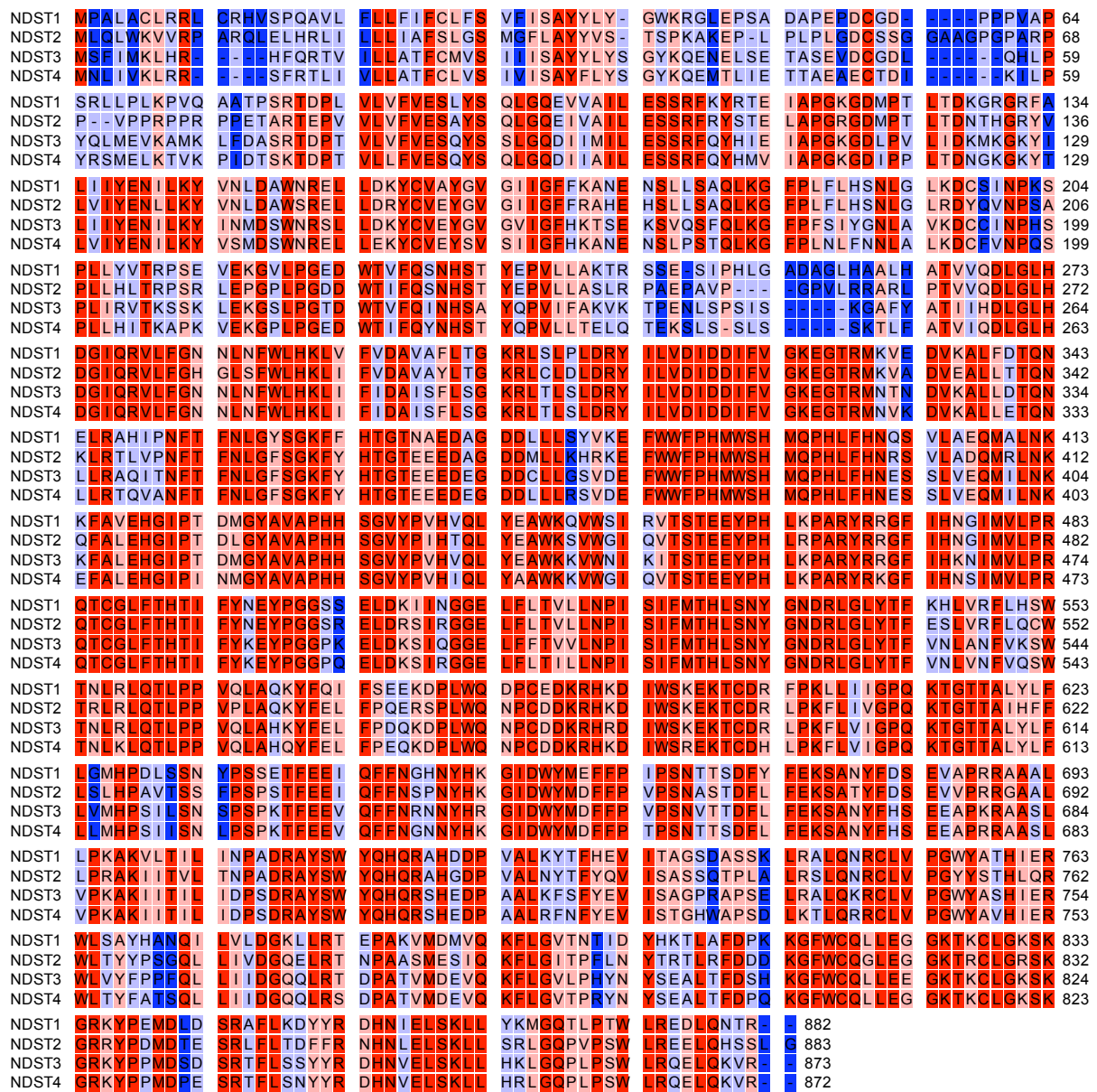


Figure 7: Alignement des séquences protéiques des différentes NDSTs humaines. Les degrés d'homologie de séquence sont indiqués par un dégradé de couleur (Rouge : acide aminé identique ; Bleu : acide aminé divergent).

Les NDSTs sont connues pour être des enzymes bi-fonctionnelles, catalysant à la fois les réactions de *N*-déacétylation et de *N*-sulfatation des résidus de GlcNAc. Des expériences utilisant des formes tronquées ont mis en évidence que le domaine portant l'activité *N*-déacétylase est situé dans la région Nt, tandis que l'activité *N*-sulfotransférase est localisée dans le domaine Ct (Duncan *et al.*, 2006). Une seule étude cristallographique a été menée à ce jour sur les NDSTs. Cette étude montre que le domaine *N*-sulfotransférase de la NDST1 complexé au PAP présente une structure sphérique composée de cinq feuillets β parallèles reliés entre eux par des hélices α . Les auteurs ont mis en évidence deux sites de fixation au PAPS : le premier, nommé 5'PSB (*5'-phosphosulfate binding motif*), et le second,

3'PB (*3'-posphate binding motif*) (Figure 8). Ces deux domaines sont également présents chez de nombreuses autres sulfotransférases (Kakuka *et al.*, 1999). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en exergue l'importance de certains résidus. Ainsi, les résidus F640, E641, E642, Q644, N647 sont importants pour la reconnaissance du substrat. Les résidus d'histidine H716 et H720 jouent un rôle critique dans le processus de catalyse, ainsi que le résidu de lysine K614 qui est conservé entre plusieurs sulfotransférases (Sueyoshi *et al.*, 1998).

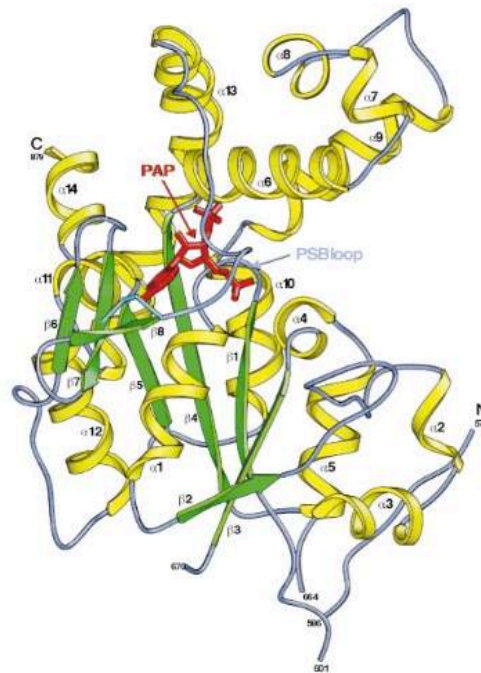


Figure 8: Représentation de la structure du domaine sulfotransférase de la NDST1 complexé au PAP. Les hélices α sont représentées en jaune, les feuillets β en vert et le PAP en rouge. D'après Kakuta *et al.*, 1999

Des études ont démontré que la présence des deux domaines catalytiques est importante pour le bon fonctionnement de l'enzyme. En effet, l'activité *N*-déacétylase est fortement diminuée lorsque l'activité *N*-sulfotransférase est inhibée. Les mêmes effets sont observés lors de mutations réalisées dans le domaine Ct portant l'activité *N*-sulfotransférase. De plus, la séparation des deux domaines catalytiques n'entraîne pas la production de domaines NS caractéristiques de ceux synthétisés par la forme sauvage de l'enzyme, ce qui suggère une coopérativité entre les deux domaines catalytiques au sein de l'enzyme (Wei *et al.*, 1993; Dou *et al.*, 2015).

Les NDSTs catalysent les deux réactions *in vitro*. Toutefois, des études ont mis en évidence des différences au niveau des substrats accepteurs et des activités catalytiques. Ainsi, la NDST4 présente une activité *N*-sulfotransférase élevée et une activité *N*-déacétylase faible tandis que l'inverse est observé pour la NDST3 (Aikawa *et al.*, 2001). En

revanche, même si les NDST1 et NDST2 possèdent un ratio d'activité similaire, leur surexpression en lignée cellulaire HEK293 aboutit à la synthèse de chaînes HS avec des profils de substitution différents. En effet, la surexpression de la NDST2 entraîne la production de chaînes HS possédant un taux plus important de motifs *N*-sulfatés et des domaines NS plus longs que ceux observés dans les cellules surexprimant la NDST1, ce qui suggère que l'activité des NDST1 et NDST2 n'est pas redondante (Cheung *et al.*, 1996; Pikas *et al.*, 2000).

Les différentes études réalisées chez la Souris confirment les résultats obtenus *in vitro*. En effet, la génération de souris déficientes pour les NDSTs a démontré que seules les souris NDST1^{-/-} présentent une diminution significative du taux de sulfatation des chaînes HS et une mortalité élevée (Ringvall *et al.*, 2000 ; Ringvall and Kjellen, 2010). Par contre, les souris déficientes pour la NDST2 présentent un phénotype et une synthèse des HS normaux dans tous les tissus, mais ne réalisent pas la synthèse d'héparine dans les mastocytes, ce qui suggère que la NDST1 catalyse une *N*-sulfatation partielle des chaînes HS et que la NDST2 agit au niveau de ces régions déjà *N*-sulfatées et catalyse la synthèse d'héparine et des chaînes HS fortement sulfatées (Ledin *et al.*, 2004; Deligny *et al.*, 2010; Ringvall and Kjellen, 2010). De plus, les travaux récents de Deligny *et al.* (2016) montrent que les souris NDST2^{-/-} possèdent un taux de chaînes HS moins important par rapport aux souris contrôles, alors que la surexpression de la NDST2 induit la formation de chaînes plus longues. Sur la base de ces travaux, les auteurs suggèrent que la sulfatation catalysée par la NDST2 participerait au processus d'élongation des chaînes HS. Les souris déficientes en NDST3 ne présentent pas de problèmes de sulfatation (Pallerla *et al.*, 2008). Comme la NDST3 possède une activité *N*-déacétylase plus importante, il a été suggéré que son rôle se limiterait uniquement à la *N*-déacétylation des résidus de GlcNAc, puisque les cellules invalidées pour les NDST1 et NDST2 ne possèdent pas de groupement *N*-sulfatés, alors que le taux de résidus de GlcN non substitués reste inchangé (Holmborn *et al.*, 2004).

Les NDST1 et NDST2 sont exprimées de manière ubiquitaire, que ce soit au stade adulte ou embryonnaire. En revanche, la distribution des NDST3 et NDST4 est beaucoup plus restreinte, puisqu'elles sont retrouvées presque exclusivement dans les cerveaux adulte et embryonnaire (Aikawa *et al.*, 2001; Yabe *et al.*, 2005; Pallerla *et al.*, 2008).

Les processus régulant l'expression des NDSTs ont fait l'objet de peu d'études. Toutefois, plusieurs observations ont mis en évidence des variations d'expression lors de processus inflammatoires. Ainsi, l'expression de la NDST1 est fortement augmentée lors de lésion vasculaire chez la Souris (Adhikari *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que plusieurs stimuli inflammatoires peuvent moduler l'expression des NDSTs. Ainsi, la stimulation de cellules endothéliales par le TNF- α entraîne une diminution de l'expression de la NDST3. De même, Carter *et al.* (2003) ont observé que l'expression des NDST1 et

NDST2 est augmentée en réponse au TNF- α ou à l'IFN- γ (Interféron- γ) dans une autre lignée de cellules endothéliales. La stimulation par le LPS, quant à elle, entraîne une augmentation de l'expression de la NDST1 et une diminution de celles des NDST2 et NDST3 (Krenn *et al.*, 2008). Il a également été montré que l'expression des NDST1, NDST2 et NDST3 est inhibée en réponse au TGF- β dans les astrocytes alors que le TGF- α module uniquement l'expression de la NDST3 (Properzi *et al.*, 2008). Des variations d'expression des NDSTs sont observées au cours de la polarisation des macrophages. L'expression des NDST1 et NDST2 est augmentée dans les macrophages pro-inflammatoires M1, alors qu'elle reste stable dans les macrophages M2 par rapport au macrophages non activés (Martinez *et al.*, 2015).

Les mécanismes à l'origine des modifications de l'expression des NDSTs sont également mal connus. Dans les mastocytes, la forte expression de la NDST2 serait dépendante de la fixation du facteur de transcription GAPB (*GA-binding protein*) sur le promoteur du gène *NDST2* (Morii *et al.*, 2001). D'autres études ont portées sur la structure des régions 5'-UTR et 3'-UTR (*Untranslated Region*) des ARNm codant pour les NDSTs. Grobe *et al.*, (2002a) ont ainsi montré que les régions 5'-UTR des ARNm des NDST2, NDST3 et NDST4 contiennent des séquences IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), connues pour initier le processus de traduction indépendamment de la coiffe, ce qui introduit un niveau de contrôle supplémentaire pour l'expression de ces enzymes. Plus récemment, des travaux ont mis en évidence une régulation de l'expression de la NDST1 par microARN. Kasza *et al.* (2013) ont montré que le miR-24 cible la NDST1 dans les cellules endothéliales, entraînant une baisse de son expression. Par conséquent, le taux de sulfatation des chaînes HS est diminué, ce qui inhibe la signalisation cellulaire induite par le VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor A*). Les mêmes observations ont été obtenues pour le miR-191 dans le cancer gastrique. En effet, le miR-191 est fortement exprimé dans ce contexte pathologique, ce qui provoque une diminution de l'expression de la NDST1 (Shi *et al.*, 2011). Enfin, l'expression du miR-149, qui cible également l'ARNm de la NDST1, est inhibée dans des cellules mammaires chimio-résistantes. Les auteurs de cette étude ont démontré que cette inhibition entraîne une hausse de l'expression de la NDST1 et suggèrent que la forte expression de la NDST1 pourrait être un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (He *et al.*, 2014).

3.2 La C5-épimérase

Après l'action des NDSTs, la seconde modification que subissent les chaînes HS est l'épimérisation de certains résidus d'acide D-glucuronique en acide L-iduronique. Cette modification est réalisée par la glucuronyl C5-épimérase. Cette enzyme est spécifique des

chaines HS et agit sur le polymère naissant, ce qui la différencie des autres épimérase existantes agissant uniquement sur des monosaccharides (Valla *et al.*, 2001).

Chez les Vertébrés, un seul gène codant pour une C5-épimérase a été identifié. Ce gène nommé *Glce* code pour une protéine d'environ 60 kDa (617 AA). Comme la quasi totalité des enzymes de maturation des HS, la C5-épimérase est une protéine transmembranaire de type II, composée d'un domaine Nt cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine intraluminal golgien ou région « tige », et enfin d'une région globulaire où se trouve le domaine catalytique (Tableau 2). Elle est très conservée entre les espèces, puisque la forme humaine présente 97 % d'homologie de séquence protéique avec les formes murine et bovine (Li, 2010).

Tableau 2: Caractéristiques de la C5-épimérase humaine

| Gène | | | | | |
|-------------|----------------------------|--|------------------|-------------------------------|-------------|
| | Localisation chromosomique | Taille du cDNA | | Taille de la séquence codante | |
| <i>GLCE</i> | 15q23 | 5080 pb | | 1853 pb | |
| Protéine | | | | | |
| | Nombre d'acides aminés | Nombre d'acides aminés des différents domaines | | | |
| | | Cytoplasmique | Transmembranaire | Tige | Catalytique |
| C5-épi | 617 | 11 | 16 | 388 | 191 |

L'étude cristallographique de Qin *et al.* (2015) a montré que la C5-épimérase est composée de trois domaines : un domaine Nt en épingle à cheveux β suivi d'un domaine en feuillet β et enfin un domaine Ct en hélice α , qui contient le site catalytique et de liaison au substrat. Cette même étude a mis en exergue la formation de dimères composés de deux monomères de l'enzyme reliés entre eux *via* leurs domaines Nt et Ct. En effet, les deux domaines Nt interagissent entre eux par des liaisons hydrophobes impliquant les résidus Y73, Y96, M97, W101, M102, F106, F121 et F123 et des liaisons ioniques impliquant deux couples (E119/R90 et D91/R89). Les interactions des deux domaines Ct se font uniquement *via* des liaisons hydrophobes impliquant six résidus (F458, M459, V515, L519, T522 et F533). Le domaine d'interaction du substrat osidique est situé dans la région Ct, ce qui suggère que la formation d'un dimère est indispensable pour la reconnaissance du substrat. Trois résidus de tyrosine ont également été identifiés par mutagenèse dirigée (Y468, 528 et 546) pour être nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme.

La C5-épimérase exerce son activité au niveau de résidus de GlcUA liés à un résidu de GlcNS à son extrémité réductrice et la présence d'un deuxième résidu de GlcNS à l'extrémité non réductrice entraîne une augmentation de sa vitesse de catalyse. Ainsi, les domaines NS et NA/NS possèdent une grande quantité de résidus d'IdoUA, à l'inverse des domaines NA. Le mécanisme d'action de l'enzyme consiste en une élimination/addition d'un proton en position C5 du résidu de GlcUA avec la possibilité d'une inversion de configuration. Au cours de cette réaction a lieu la formation d'un carbanion intermédiaire qui n'entraîne pas de rupture de liaison osidique (Valla *et al.*, 2001). Alors que l'activité de l'enzyme est réversible *in vitro*, il semble qu'elle soit irréversible *in vivo*. Toutefois, Sheng *et al.* (2012) ont démontré que la réversibilité de l'activité de l'enzyme dépend en fait de la nature du substrat polysaccharidique. En effet, le résidu de GlcN en position -3 du résidu de HexUA modifié joue un rôle clé : la présence d'un résidu de GlcNS ou GlcNH₂ rend l'activité de l'enzyme réversible alors que la présence d'un résidu de GlcNAc la rend irréversible. De plus, la présence de motifs 2-O- et/ou 6-O-sulfatés entraîne une inhibition de l'activité de l'enzyme, ce qui explique que la C5-épimérase agisse en amont de ces deux modifications.

La plupart des études montre une localisation golgienne de la C5-épimérase, en association avec la 2-OST. Toutefois, d'autres travaux ont suggéré qu'elle serait également capable d'interagir avec la 6-OST1. Bien que ces interactions ne soient pas nécessaires à l'activité catalytique de l'enzyme, elles pourraient contribuer à la localisation golgienne et/ou à la stabilité de la protéine (Pinhal *et al.*, 2001 ; Préchoux *et al.*, 2015 ; Qin *et al.*, 2015). De manière surprenante, la surexpression de la C5-épimérase dans des cellules HEK 293 induit la synthèse de chaînes HS plus longues. En revanche, les cellules surexprimant la C5-épimérase et la 2-OST de manière simultanée synthétisent des chaînes HS de taille normale, suggérant une coopérativité entre les deux enzymes (Fang *et al.*, 2016).

Les souris déficientes pour la C5-épimérase présentent d'importants défauts de développement. L'analyse des chaînes HS chez ces souris montre une absence totale de résidus IdoUA et une augmentation du disaccharide HexUA-GlcNS6S (Ledin *et al.*, 2004). De plus, Dierker *et al.* (2016) ont montré une augmentation du taux de différenciation et de prolifération de chondrocytes isolés chez les souris déficientes en C5-épimérase. Le mécanisme impliquerait la signalisation cellulaire médiée par l'interaction entre le facteur IHH (*Indian Hedgehog*) et les chaînes HS. La C5-épimérase serait également impliquée dans la balance entre la prolifération et la différenciation des cellules souches neuronales. L'inactivation d'expression de l'enzyme inhibe la croissance cellulaire, mais favorise la différenciation induite par le NGF (*Nerve Growth Factor*) et la formation des dendrites *via* un mécanisme dépendant de l'activation des protéines SMAD 1/3 et 8 (Li *et al.*, 2014).

Peu d'études se sont intéressées à la régulation de l'expression de la C5-épimérase. Il a été démontré que le complexe β -caténine/TCF-4 (*T-cell factor-4*) est impliqué dans la

régulation transcriptionnelle de l'enzyme (Ghiselli and Agrawal, 2005). Plus récemment, Mostovich *et al.* (2012) ont montré que la fixation de ce complexe sur le promoteur du gène *Gfce* est favorisée par des mécanismes de remodelage de la chromatine, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de la C5-épimérase *in vitro* et *in vivo*. L'expression de l'enzyme est également régulée de manière post-transcriptionnelle par le miR-218 dans des cellules mammaires. En effet, la surexpression de ce microARN ne modifie pas le taux d'ARNm codant pour la C5-épimérase mais elle inhibe la traduction de l'enzyme. Les mêmes observations ont été faites au niveau de la rétine, où l'inhibition de l'enzyme par le miR-218 est essentielle pour la vascularisation (Small *et al.*, 2010 ; Prudnikova *et al.*, 2012).

3.3 La 2-O-sulfotransférase

La 2-O-sulfotransférase (2-OST/HS2ST) catalyse le transfert d'un groupement sulfate en position 2 des résidus d'acides héxuroniques. Comme la C5-épimérase, elle est codée par un seul gène, nommé *Hs2st1*, qui produit une protéine transmembranaire de type II de 356 AA (Tableau 3).

Tableau 3: Caractéristiques de la 2-O-sulfotransférase humaine.

| Gène | | | | | |
|---------------|----------------------------|--|------------------|-------------------------------|-------------|
| | Localisation chromosomique | Taille du cDNA | | Taille de la séquence codante | |
| <i>HS2ST1</i> | 1p22.3 | 6770 pb | | 1070 pb | |
| Protéine | | | | | |
| | Nombre d'acides aminés | Nombre d'acides aminés des différents domaines | | | |
| | | Cytoplasmique | Transmembranaire | Tige | Catalytique |
| HS2ST | 356 | 11 | 16 | 43 | 255 |

Les travaux de Xu *et al.* (2007) ont mis en évidence six acides aminés impliqués dans la fixation du PAPS : K83, T84, S86, T87, R164 et S172. Ils ont également identifié cinq résidus permettant la fixation du substrat oligosaccharidique (arginines R80, R178, R189, et acide aspartique D181) ainsi que deux résidus d'histidine (H140 et H142) nécessaires à l'activité catalytique de l'enzyme. Des expériences de cristallographie ont montré que la 2-OST peut exister sous forme d'un homotrimer. L'interaction entre les différents monomères se fait par l'intermédiaire des domaines transmembranaires (Figure 9). Ce type de conformation suggère que les trois domaines catalytiques peuvent fonctionner de façon indépendante (Bethea *et al.*, 2008). De plus, la 2-OST a été décrite pour former un complexe

avec la C5-épimérase *in vivo* (Pinhal *et al.*, 2001). Toutefois, la C5-épimérase ne peut pas être un des constituants du trimère puisque la 2-OST purifiée à partir de cellules CHO forme un trimère mais ne contient pas la C5-épimérase. Il est probable que ces deux enzymes soient regroupées *in vivo* au sein d'un complexe macromoléculaire, constitué de la 2-OST sous forme trimérique et de la C5-épimérase.

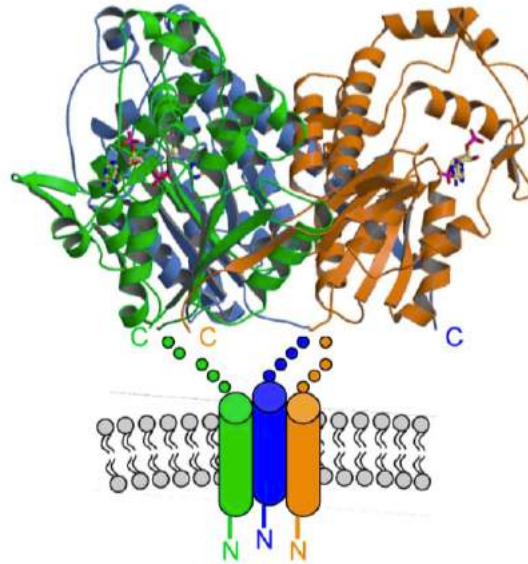


Figure 9: Représentation du complexe trimérique formé par les domaines catalytiques de trois monomères de 2-OST complexés au PAP. Les monomères sont représentés en vert, bleu et orange. D'après Bethea *et al.*, 2008.

De nombreuses études se sont intéressées à la spécificité de substrat de la 2-OST. Cette enzyme sulfate préférentiellement les résidus d'IdoUA, mais elle est également capable de modifier les résidus de GlcUA. En effet, l'analyse structurale des HS de cellules CHO_{psgF-17}, déficientes pour la 2-OST, a montré non seulement une absence quasi-totale de motifs HS contenant des résidus IdoUA2S, mais également une disparition des résidus GlcUA2S (Rong *et al.*, 2000, 2001). De plus, l'action du complexe C5-épimérase/2-OST sur un substrat contenant uniquement des résidus de GlcUA conduit à la formation de résidus de GlcUA2S et IdoUA2S en proportion équivalente (Smeds *et al.*, 2010). Une autre étude a mis en exergue l'importance de plusieurs résidus dans la spécificité de substrat de la 2-OST. Ainsi, le mutant R189A sulfat uniquement les résidus de GlcUA de la chaîne HS en cours de synthèse, alors que les mutants Y94A et H106A modifient préférentiellement des résidus de IdoUA (Bethea *et al.*, 2008).

Les résidus IdoUA2S sont le plus souvent retrouvés au sein des domaines NS et NA/NS. En effet, la 2-OST agit de manière préférentielle sur des résidus d'acide uronique situés en position réductrice de résidus de GlcNS, comme la C5-épimérase. De plus, Smeds *et al.* (2010) ont démontré une affinité plus forte de la 2-OST pour des substrats possédant déjà un résidu 2-O-sulfaté, suggérant ainsi une activité processive de l'enzyme.

La 2-OST est exprimée de manière ubiquitaire chez l'adulte avec de fortes variations d'expression selon le type cellulaire. Chez l'embryon, l'expression de l'enzyme est variable selon le stade de développement et le type de tissu. Les souris déficientes pour la 2-OST montrent de graves malformations au niveau des reins, des yeux et des os (Bullock *et al.*, 1998; Rong *et al.*, 2001). En réponse à une stimulation inflammatoire, les souris 2OST^{-/-} générées par le système *Cre-Lox* présentent également une infiltration leucocytaire plus importante, qui est due à une meilleure présentation de l'IL-8 et de la chimiokine MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein-2*). De même, il a été démontré que les domaines 2-O-sulfatés portés par les chaînes HS du syndécan-1 inhibent la dégranulation des neutrophiles lors de l'infection de la cornée par *Staphylococcus aureus* (Axelsson *et al.*, 2012; Hayashida *et al.*, 2015). Finalement les travaux de Martinez *et al.* (2015) montrent que la 2-OST est fortement exprimée dans les macrophages M2 et à l'inverse peu présente dans les macrophages pro-inflammatoires, ce qui souligne son importance au cours de la réponse inflammatoire.

La 2-O-sulfatation module la fixation de plusieurs ligands protéiques. Par exemple, il a été démontré que l'inactivation de la 2-OST inhibe la fixation et l'entrée du virus HSV-1 sur ses cellules cibles (O'Donnell *et al.*, 2010). De même, la signalisation médiée par le FGF-10 est dépendante de chaînes HS possédant des groupements 2-O-sulfatés, ce qui est essentiel dans les processus de développement des membres et des glandes lacrymales (Patel *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2011).

3.4 Les 6-O-sulfotransférases

La famille des glucosaminyl 6-O-sulfotransférases (6-OSTs/HS6STs) catalyse le transfert d'un groupement sulfate en position 6 du résidu de GlcN. Chez les Vertébrés, trois isoenzymes, codées par trois gènes distincts, ont été caractérisées (Tableau 4). Une quatrième forme, nommée 6-OST2S, est produite chez l'Homme et la Souris par épissage alternatif du gène codant pour la 6-OST2. Cela conduit à la production d'une enzyme où 40 acides aminés de la région « tige » sont délétés. L'alignement des séquences protéiques montre que les 6-OSTs possèdent moins d'homologie de séquence que les autres familles de sulfotransférases. En effet, la 6-OST1 présente 51% et 53% d'homologie de séquence avec les 6-OST2 et 3, respectivement. Quant aux 6-OST2 et 3, elles partagent 50% de similarité. Toutefois, les trois isoenzymes présentent une forte homologie de séquence au niveau de leur domaine de liaison au PAPS (Figure 10). Comme la plupart des sulfotransférases, les 6-OSTs sont des protéines transmembranaires de type II localisées dans l'appareil de Golgi. La région « tige » a été identifiée pour être importante dans le maintien de la conformation active et de la localisation (Nagai *et al.*, 2004). De plus, des études ont démontré que les 6-OSTs peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire.

Les auteurs ont mis en évidence un mécanisme dépendant d'une β -sécrétase. La 6-OST3 s'accumule dans l'appareil de Golgi lorsque l'activité β -sécrétase est inhibée, ce qui augmente ainsi le taux de 6-O-sulfatation. Ces travaux suggèrent que le taux de motifs 6-O-sulfatés peut être modulé en régulant la concentration intracellulaire des 6-OSTs (Habuchi *et al.*, 1995; Do *et al.*, 2006; Nagai *et al.* 2007).

Tableau 4: Caractéristiques des 6-O-sulfotransférases humaines

| Gène | | | | | |
|----------|----------------------------|--|------------------|-------------------------------|-------------|
| | Localisation chromosomique | Taille du cDNA | | Taille de la séquence codante | |
| HS6ST1 | 2q21 | 3966 pb | | 1235 pb | |
| HS6ST2 | Xq26.2 | 4576 pb | | 1937 pb | |
| HS6ST3 | 13q32.1 | 7817pb | | 1415 pb | |
| Protéine | | | | | |
| | Nombre d'acides aminés | Nombre d'acides aminés des différents domaines | | | |
| | | Cytoplasmique | Transmembranaire | Tige | Catalytique |
| HS6ST1 | 411 | 17 | 19 | 48 | 265 |
| HS6ST2 | 645 | 5 | 22 | 198 | 265 |
| HS6ST3 | 471 | 5 | 33 | 117 | 266 |

Les 6-OSTs présentent une spécificité de substrat large, ce qui explique que des motifs HS 6-O-sulfatés soient présents au sein des domaines NS, NA et NA/NS. Toutefois, cette modification est le plus souvent retrouvée au niveau des domaines NS à proximité de résidus d'IdoUA2S. Les différentes études menées sur ce sujet montrent que les 6-OSTs sont capables de sulfater *in vitro* un large panel de structures HS, quelque soit la nature du résidu d'HexUA et l'état de sulfatation du résidu de GlcN. Toutefois, chaque isoenzyme présente des substrats préférentiels. Ainsi, la 6-OST1 agit préférentiellement sur des substrats où le résidu d'HexUA n'est pas 2-O-sulfaté. En effet, l'analyse structurale des HS isolés à partir de différents organes de souris 6OST1^{-/-} montre une réduction prononcée des disaccharides HexUA-GlcNS6S et HexUA-GlcNAc6S, alors que la diminution du disaccharide trisulfaté HexUA2S-GlcNS6S est moins marquée (Smeds *et al.*, 2003). Les 6-OST2 et 6-OST3 sont plus actives sur des substrats 2-O-sulfatés. Toutefois, l'activité de la 6-OST2 peut varier en fonction de la concentration en substrat (Habuchi *et al.*, 2000). Comme pour la NDST1, la 6-OST1 possède une activité plus faible au niveau de l'extrémité non

déficientes pour les 6-OST1 et 6-OST2 présentent des défauts importants de développement et décèdent encore plus précocement que les souris déficientes pour la 6-OST1 seule, ce qui suggère que les deux isoenzymes possèdent des activités complémentaires (Habuchi *et al.*, 2010). Il a été démontré que les héparanes 6-O-sulfatés sont nécessaires à la fixation de facteurs de croissance et morphogènes sur leurs cellules cibles, par exemple le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*). Ainsi, l'absence de résidus 6-O-sulfatés chez les souris déficientes pour les différentes 6-OSTs diminuerait fortement la signalisation induites par ces molécules, altérant ainsi le développement des souris (Delehedde *et al.*, 2000; Ferreras *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont montré des variations d'expression des 6-OSTs au cours de certaines pathologies, tels que le cancer de l'ovaire (Backen *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2014). Les 6-OST1 et 6-OST2 sont surexprimées au cours de la fibrose pulmonaire, respectivement dans les fibroblastes et les cellules épithéliales (Lu *et al.*, 2014). En revanche, l'expression de la 6-OST2 est inhibée dans les phénomènes d'arthrites osseuses (Wang *et al.*, 2011).

3.5 Les 3-O-sulfotransférases

Dans le schéma général de maturation des HS, la dernière étape est assurée par les glucosaminyl 3-O-sulfotransférases (3-OSTs/HS3STs). Elles catalysent le transfert d'un groupement sulfate sur la fonction hydroxyle en position C3 du résidu de GlcN. Cette modification est rare puisqu'en moyenne, seulement 5% des disaccharides sont 3-O-sulfatés (Thacker *et al.*, 2014).

Chez les Vertébrés, sept isoenzymes ont été clonées, purifiées et caractérisées, nommées 3-OST1, 2, 3A, 3B, 4, 5 et 6. Une isoenzyme supplémentaire, 3-OST7, a été identifiée chez le poisson zèbre (3-OST7) (Tableau 5). Les 3-OSTs sont très conservées puisqu'elles possèdent environ 60% d'homologie de séquence au niveau de leur extrémité C-terminale, contenant le domaine sulfotransférase. En revanche, les domaines situés au niveau de leur extrémité N-terminale sont de taille variable et différent au niveau de leur séquence en acides aminés, ce qui pourrait contrôler leur localisation subcellulaire (Figure 11). A l'exception de la 3-OST1, qui a été décrite comme une protéine intraluminaire golgienne, toutes les 3-OSTs sont des protéines transmembranaires de type II.

Sur la base de leur homologie de séquence et de leur spécificité de substrat, les 3-OSTs peuvent être classées en deux groupes : le premier est formé par les 3-OST1 et 5 tandis que le second regroupe les 3-OST2, 3A, 3B, 4 et 6. Ainsi, les 3-OST1 et 5 sont impliquées dans la synthèse des motifs reconnus par l'antithrombine-III (AT-III) ; elles sont nommées « 3-OSTs de type AT ». Les 3-OST2, 3A, 3B, 4 et 6 sont capables de générer le motif reconnu par la protéine gD du virus HSV-1, c'est pourquoi elles sont regroupées sous la dénomination « 3-OSTs de type gD ».

Tableau 5: Caractéristiques des 3-O-sulfotransférases humaines

| Gène | | | | | |
|-----------------|----------------------------|--|------------------|-------------------------------|-------------|
| | Localisation chromosomique | Taille du cDNA | | Taille de la séquence codante | |
| <i>HS3ST1</i> | 4p16 | 1965 pb | | 923 pb | |
| <i>HS3ST2</i> | 16p12 | 1968 pb | | 1103 pb | |
| <i>HS3ST3A1</i> | 17p12 | 4199 pb | | 1220 pb | |
| <i>HS3ST3B1</i> | 17p12 | 5416 pb | | 1172 pb | |
| <i>HS3ST4</i> | 16p11.2 | 3203 pb | | 1370 pb | |
| <i>HS3ST5</i> | 6q22.1 | 2744 pb | | 1040 pb | |
| <i>HS3ST6</i> | 16p13.3 | 1169 pb | | 1028 pb | |
| Protéine | | | | | |
| | Nombre d'acides aminés | Nombre d'acides aminés des différents domaines | | | |
| | | Cytoplasmique | Transmembranaire | Tige | Catalytique |
| HS3ST1 | 307 | | | | 237 |
| HS3ST2 | 367 | 19 | 21 | 75 | 237 |
| HS3ST3A | 406 | 24 | 18 | 108 | 237 |
| HS3ST3B | 390 | 32 | 20 | 83 | 237 |
| HS3ST4 | 456 | 34 | 24 | 137 | 237 |
| HS3ST5 | 346 | 13 | 29 | 57 | 240 |
| HS3ST6 | 342 | 31 | 17 | 41 | 235 |

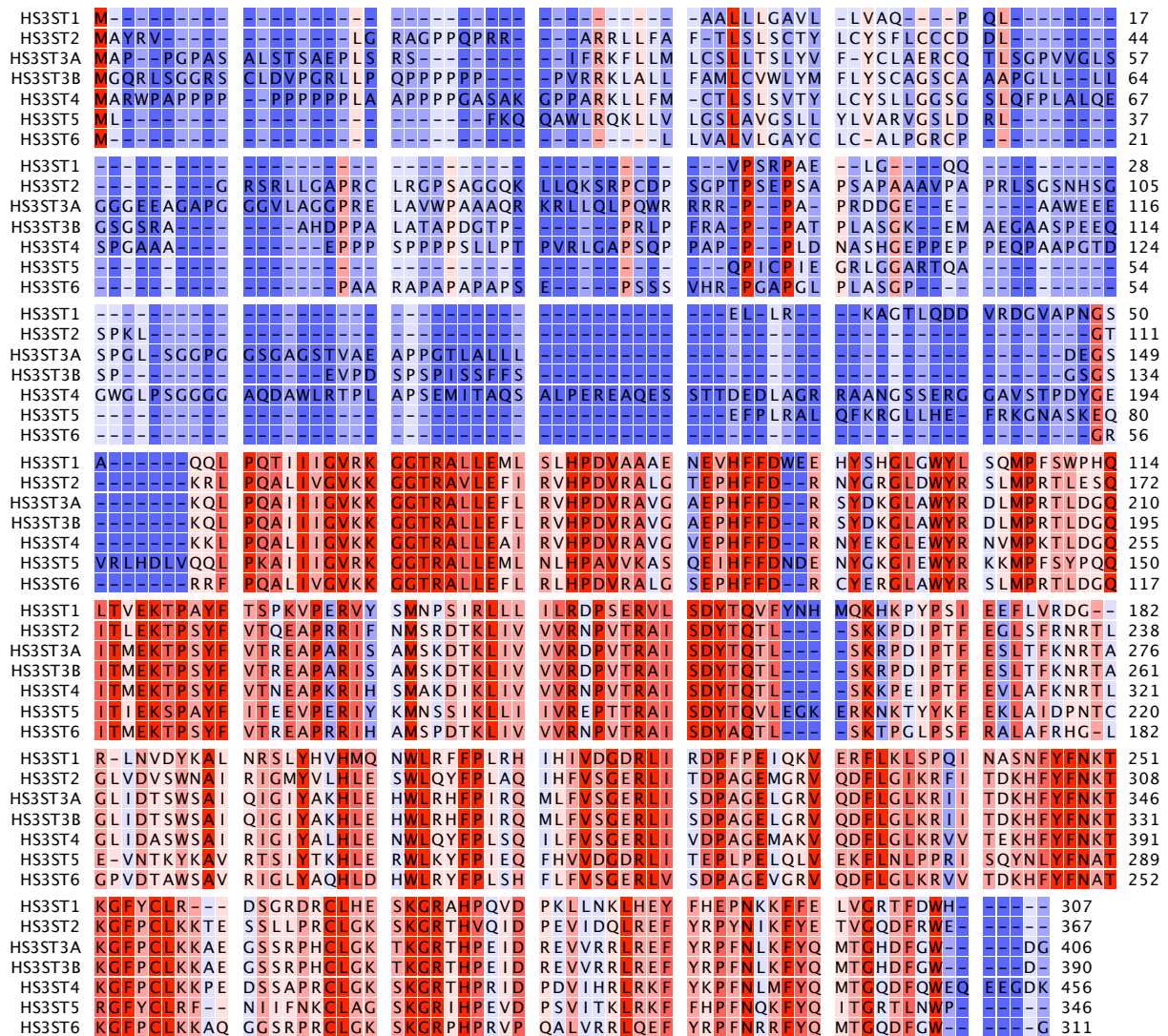


Figure 11: Alignement des séquences protéiques des différentes 3-OSTs humaines. Les homologies de séquence sont indiquées par un dégradé de couleur (Rouge : acide aminé identique ; Bleu : acide aminé divergent).

La structure des 3-OST1, 3A et 5 a été élucidée par cristallographie (Edavettal *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008) (Figure 12). Ces études ont permis de mettre en évidence une structure similaire entre les domaines sulfotransférases des 3-OSTs et celui des NDSTs, ce qui est en cohérence avec l'homologie de séquence que présente les domaines de ces enzymes (environ 50%). Comme pour la NDST1, le domaine catalytique de la 3-OST3A présente une conformation sphérique avec un large sillon ouvert où se loge l'oligosaccharide. Cette structure est formée par cinq feuillets β parallèles entourés d'hélices α . Les sites 5'PSB et 3'PB de fixation du PAPS sont situés au centre de cette structure (Moon *et al.*, 2004). Les structures des 3-OST1 et 5 sont globalement similaires à celle de la 3-OST3A, avec néanmoins de légères différences au niveau des boucles externes. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les acides aminés clés dans l'activité de ces enzymes. Il a été démontré qu'un résidu d'acide glutamique, conservé dans

la NDST1 et dans toutes les 3-OSTs, est indispensable à l'activité catalytique. En effet, sa mutation n'affecte ni la fixation de l'oligosaccharide ni celle du PAPS, mais conduit à une inhibition quasi totale de leur activité sulfotransférase. D'autres études ont permis d'identifier des acides aminés impliqués dans la fixation de l'oligosaccharide. Les travaux de Edavettal *et al.* (2004b) ont démontré l'importance des résidus R67, R72 et R276 ainsi que K123 présents dans la séquence de la 3-OST1 dans la fixation du substrat. Toutefois, l'absence de ces résidus ne modifie pas la capacité de la 3-OST1 à fixer le PAPS *via* les domaines 5'PSB et 3'PB. De même, Moon *et al.* (2004) ont co-cristallisé la 3-OST3A avec un tétrasaccharide et ont identifié trois résidus de lysines (K161, K215 et K368) et deux résidus d'arginine (R166 et R370) impliqués dans la reconnaissance du substrat.

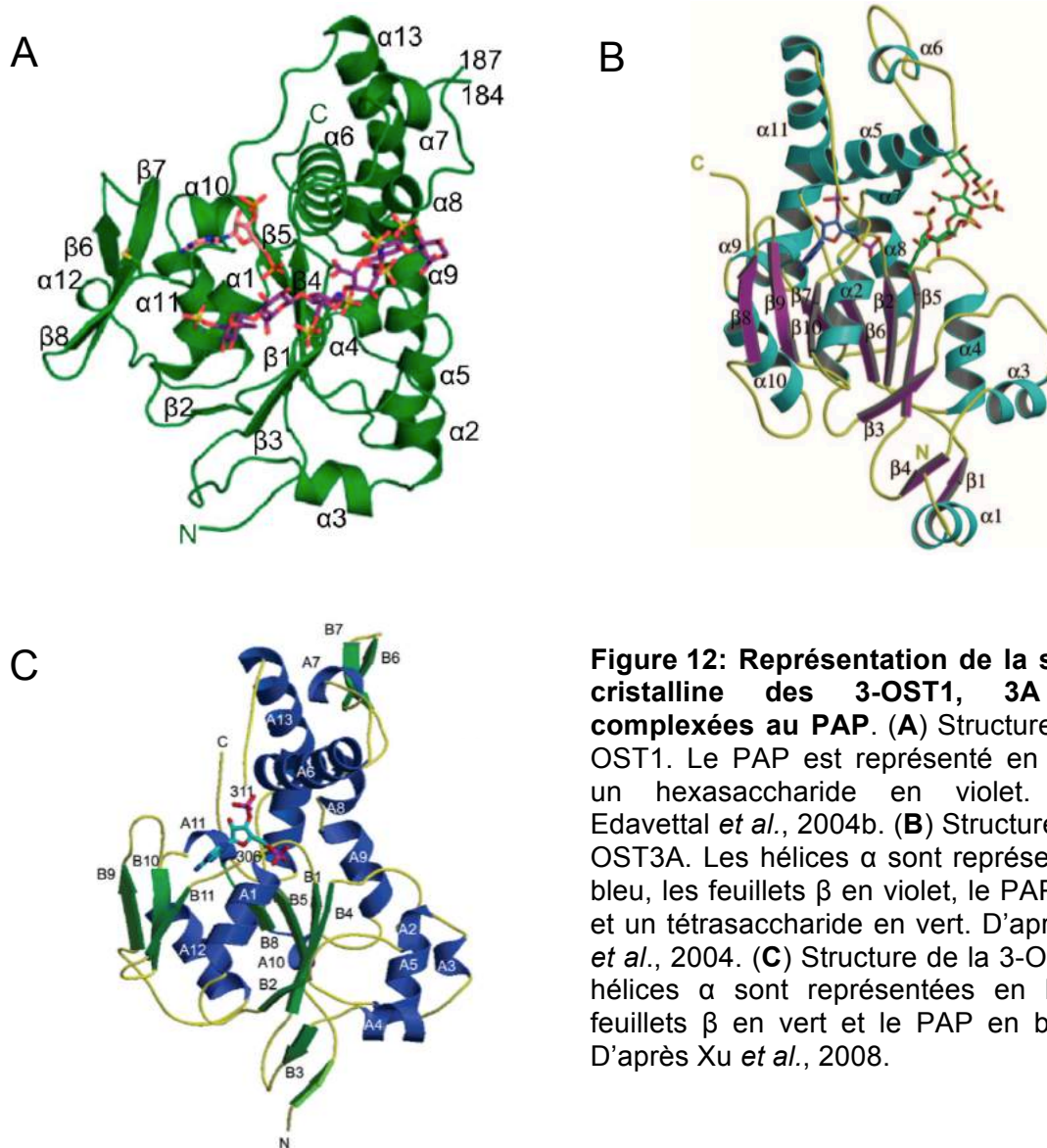


Figure 12: Représentation de la structure cristalline des 3-OST1, 3A et 5 complexesées au PAP. (A) Structure de la 3-OST1. Le PAP est représenté en rouge et un hexasaccharide en violet. D'après Edavettal *et al.*, 2004b. (B) Structure de la 3-OST3A. Les hélices α sont représentées en bleu, les feuillets β en violet, le PAP en bleu et un tétrasaccharide en vert. D'après Moon *et al.*, 2004. (C) Structure de la 3-OST5. Les hélices α sont représentées en bleu, les feuillets β en vert et le PAP en bleu clair. D'après Xu *et al.*, 2008.

Comme d'autres sulfotransférases, les 3-OSTs forment des complexes multimériques. Ainsi, la 3-OST3A est capable de se fixer aux chaînes HS et CS avec la

même affinité, mais seuls les HS sont en capacité d'induire son oligomérisation, nécessaire à son activité catalytique. Il a également été démontré que l'interaction entre la 3-OST1 et les HS provoque un changement conformationnel de cette dernière, qui serait à l'origine de la formation de complexes multimériques (Edavettal *et al.*, 2004; Wille *et al.*, 2007).

Les 3-OSTs peuvent être regroupées en fonction de leur spécificité de substrat et de leur capacité à générer les motifs 3-O-sulfatés reconnus soit par l'AT-III (GlcNAc/NS6S-GlcUA-GlcNS \pm 6S-IdoUA2S-GlcNS6S), soit par la protéine gD du virus HSV-1 (IdoUA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNAc-UA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNH $_2$ \pm 6S). Ainsi, les 3-OST1 et 3-OST5 agissent préférentiellement sur des motifs contenant un résidu de GlcUA localisé du côté non-réducteur d'un résidu de GlcNS \pm 6S. L'enzyme peut tolérer la présence d'un résidu de IdoUA à la place du résidu de GlcUA, mais il ne peut en aucun cas être 2-O-sulfaté. En revanche, les 3-OST de type gD sont en capacité de modifier des résidus de GlcNS \pm 6S ou GlcNS \pm 6S liés à un résidu de IdoUA2S du côté non-réducteur. L'acide uronique peut éventuellement être un GlcUA2S. Cette différence s'explique par la présence d'un résidu de lysine dans le site catalytique conservé chez les 3-OSTs à l'exception de la 3-OST1, qui présente un résidu d'asparagine incapable de neutraliser la charge du résidu 2-O-sulfaté. La 3-OST3A va préférentiellement catalyser la réaction de 3-O-sulfatation sur des résidus de GlcNS6S avec la présence d'un résidu de IdoUA du côté réducteur (Nguyen *et al.*, 2012). La 3-OST5 possède une spécificité de substrat plus large et peut générer aussi bien des motifs reconnus par l'AT-III ou par la protéine gD. A l'exception de la 3-OST1, toutes les 3-OSTs sont en capacité de former *in vitro* l'unité disaccharidique tétrasulfatée : IdoUA2S-GlcNS6S \pm 3S. Cette modification est certes retrouvée de manière étendue dans l'organisme, mais avec une prévalence très faible (0,15 à 1% des disaccharides) (Mochizuki *et al.*, 2008).

Chez les Vertébrés, l'expression des 3-OSTs est régulée de manière spatio-temporelle (Tableau 6). Alors que les 3-OST1, 3-OST3A et 3-OST3B possèdent une distribution tissulaire assez large, l'expression des 3-OST2, 3-OST4 et 3-OST5 est plus restreinte à certains tissus.

La 3-O-sulfatation des chaînes HS a été essentiellement étudiée dans le cadre des interactions avec trois ligands : l'AT-III, la cyclophiline B (CyPB) et la glycoprotéine gD du virus HSV-1 (Shukla *et al.*, 1999 ; Vanpouille *et al.*, 2007 ; Deligny *et al.*, 2010 ; Thacker *et al.*, 2014). Toutefois, des études récentes ont mis en évidence d'autres ligands des héparanes 3-O-sulfatés, comme le FGF-7 (Mao *et al.*, 2016). De plus, les travaux de Thacker *et al.* (2016) ont montré des interactions entre les héparanes 3-O-sulfatés et la neuropiline-1. Les fonctions associées à cette modification seront abordées dans la Partie 3.

La régulation de l'expression des 3-OSTs est encore mal connue. Toutefois, des études ont démontré des variations d'expression des 3-OSTs en condition inflammatoire. *In vivo*, l'IL-6 augmente l'expression de la 3-OST3A (Wood *et al.*, 2011). La stimulation de

cellules endothéliales par le LPS entraîne une diminution de l'expression des 3-OST1 et 3-OST2, alors que l'expression de la 3-OST1 est augmentée dans l'épithélium intestinal en présence de cytokine de type Th2 (Krenn *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2010). Les travaux de Martinez *et al.* (2015) montre que la 3-OST2 est fortement exprimée dans les macrophages M2 tandis que les macrophages pro-inflammatoires de type 1 expriment majoritairement la 3-OST3B.

Tableau 6: Distribution tissulaire des différents 3-OSTs. D'après Shworak *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2003, 2008; Xu *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2007; Deligny *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2015.

| Enzyme | Profil d'expression |
|---------|---|
| 3-OST1 | Large (surtout cerveau, rein) |
| 3-OST2 | Cerveau, lignées myéloïdes (macrophage) |
| 3-OST3A | Large (surtout placenta, cœur) |
| 3-OST3B | Large (surtout placenta, foie, lignées myéloïdes) |
| 3-OST4 | Cerveau |
| 3-OST5 | Cerveau, moelle épinière, muscle squelettique |
| 3-OST6 | Foie, rein |

3.6 Les 6-O-endosulfatases

Après les étapes de biosynthèse et de maturation, les chaînes HS peuvent subir une dernière modification à l'extérieur de la cellule par l'intermédiaire de deux 6-O-endosulfatases, dénommées Sulf-1 et Sulf-2. Ces deux isoenzymes éliminent des groupements 6-O-sulfatés des résidus de GlcNS au niveau des chaînes HS.

Initialement isolée chez la Caille par Dhoot *et al.* (2001), l'orthologue de Sulf-1 chez l'Homme et la Souris fut caractérisé l'année suivante, avec une protéine apparentée nommée Sulf-2. Ces deux enzymes appartiennent à la famille des aryl-sulfatases, qui compte à ce jour 17 membres (Morimoto-Tomita *et al.*, 2002). Elles possèdent entre 6 et 12 sites putatifs de N-Glycosylation. Alors que l'importance des chaînes glycaniques dans

l'activité et la localisation de l'orthologue de Sulf-1 a été démontré chez la Caille, leurs fonctions restent encore inconnues chez l'Homme (Tang *et al.*, 2009). Sulf-1 et Sulf-2 sont codées par deux gènes distincts et présentent 64% d'homologie de séquence (Figure 13 ; Tableau 7).



Tableau 7: Caractéristiques des 6-O-endosulfatases humaines

| Gène | | | | | |
|---------------|----------------------------|--|-------------------------------|-----|------------|
| | Localisation chromosomique | Taille du cDNA | Taille de la séquence codante | | |
| <i>hSULF1</i> | 8q13.2 | 5716 pb | 2615 pb | | |
| <i>hSULF2</i> | 20q13.12 | 3909 pb | 2612 pb | | |
| Protéine | | | | | |
| | Nombre d'acides aminés | Nombre d'acides aminés des différents domaines | | | |
| | | Signal | CAT | HD | C-Terminal |
| Sulf-1 | 871 | 24 | 372 | 300 | 175 |
| Sulf-2 | 870 | 22 | 372 | 300 | 176 |

Les Sulfs possèdent une organisation structurale similaire. Les deux isoenzymes possèdent à l'extrémité Nt une séquence signal, suivie d'un domaine catalytique (CAT) qui contient l'activité sulfatase, un domaine hydrophobe (HD) et enfin un domaine Ct (Tableau 7). Un résidu de cystéine, conservé dans toutes les sulfatases, est retrouvé au sein du domaine catalytique. Converti en résidu de N-formylglycine par des enzymes dénommées SUMFs (*Sulfatase Modifying factors*), il est nécessaire à l'activité catalytique des Sulfs (Hanson *et al.*, 2004). Tandis que le domaine CAT possède une forte homologie de séquence avec celui des autres sulfatases, le domaine HD est spécifique des Sulfs, puisqu'aucune homologie de séquence n'a été mise en évidence à ce jour avec d'autres protéines. Frese *et al.* (2009) ont montré que la délétion du domaine HD des Sulfs entraîne une augmentation de la sécrétion de Sulf-1 dans le milieu extracellulaire, ce qui suggère son importance dans la rétention de l'enzyme à la surface cellulaire. De plus, les auteurs ont démontré une importance du domaine HD dans la reconnaissance du substrat oligosaccharidique. Ainsi, la proportion du disaccharide trisulfaté HexUA2S-GlcNS6S est très faible dans les HS en présence de la forme totale de l'enzyme alors qu'elle reste importante lorsque Sulf-1 est délétée de son domaine HD.

La forme mature des Sulfs est un hétérodimère, formé par l'association de deux sous-unités de 50 kDa et 75 kDa *via* des ponts disulfures. Les deux sous-unités sont libérées à partir de formes précurseurs de 125 kDa par un clivage protéolytique réalisé par la furine au niveau de deux sites potentiels de coupure. Toutefois, le rôle précis de ce clivage n'est pas encore clairement établi (Tang *et al.*, 2009; Nagamine *et al.*, 2010).

Les deux isoenzymes agissent de manière préférentielle au niveau du disaccharide trisulfaté HexUA2S-GlcNS6S et de façon plus restreinte sur le disaccharide HexUA-GlcNS6S. La *N*-sulfatation est une modification importante puisque l'activité des Sulfs est fortement inhibée en absence de cette modification. Les travaux de Seffouh *et al.* (2013) ont démontré une activité processive des deux enzymes, qui débute leur réaction préférentiellement à l'extrémité non-réductrice des chaînes HS, tout en ciblant également les domaines NS situés au sein de la chaîne. Toutefois, les Sulfs ne possèdent pas la même cinétique enzymatique, puisque les auteurs ont démontré que l'activité sulfatase de Sulf-1 est supérieure à celle de Sulf-2, ce qui explique que l'inhibition de Sulf-1 entraîne de profonds changements dans la structure des chaînes HS, alors que celle de Sulf-2 entraîne peu de changements structuraux (Nagamine *et al.*, 2012).

Les deux enzymes sont exprimées dans de nombreux tissus, mais leur distribution est différente, ce qui suggère que leurs activités ne sont pas redondantes selon le type cellulaire. Elles sont aussi finement régulées de manière spatio-temporelle au cours du développement (Morimoto-Tomita *et al.*, 2002; Lum *et al.*, 2007). De manière surprenante, les souris déficientes pour Sulf-1 ou Sulf-2 ne présentent pas de défaut majeur de

développement, hormis une réduction de poids et quelques malformations chez les souris Sulf-2^{-/-}. En revanche, les animaux déficients pour les deux enzymes présentent d'importants défauts de développement et décèdent très rapidement. Ces observations suggèrent que l'absence d'une des deux sulfatases peut être compensée par la présence de l'autre (Lamanna *et al.*, 2006; Ai *et al.*, 2007; Holst *et al.*, 2007).

Les Sulfs sont en capacité de moduler les interactions entre les chaînes HS et de nombreux facteurs de croissance et morphogènes, ce qui influence le développement et les processus de prolifération, migration et différenciation cellulaire. Par exemple, l'action des Sulfs inhibe les réponses induites par les FGFs. Il a été démontré que des chaînes HS contenant de résidus de GlcNS6S liés à des résidus d'HexUA2S sont nécessaires à la formation d'un complexe de signalisation stable entre les FGFs et leurs récepteurs. En catalysant l'élimination des groupements 6-O-sulfatés, les Sulfs entraînent la déstabilisation de ces complexes (Wang *et al.*, 2004). À l'inverse, l'élimination des groupements 6-O-sulfatés active les BMP (*Bone Morphogenic Protein*), qui sont libérés des chaînes HS après action des Sulfs, permettant ainsi leur interaction avec leurs récepteurs (Viviano *et al.*, 2004). De même, l'action des Sulfs entraîne la libération des facteurs Wnt des chaînes HS, qui ont alors la capacité d'interagir avec le récepteur *Frizzled* et induire ainsi les réponses cellulaires associées (Ai *et al.*, 2003).

Le rôle des Sulfs dans les processus cancéreux a été largement étudié. Les études actuelles montrent des actions contradictoires, ce qui ne permet pas de définir clairement l'impact de ces enzymes dans la pathologie. En effet, l'expression de Sulf-1 est réduite dans les cancers du foie, du rein et de la vessie, alors qu'elle est augmentée dans les tumeurs du sein, poumon, pancréas, cerveau et dans les leucémies (Khurana *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2013; Vivès *et al.*, 2014). Dans le cas de Sulf-2, elle est généralement surexprimée dans la plupart des cancers (Phillips *et al.*, 2012; Hammond *et al.*, 2014; Vivès *et al.*, 2014). Par conséquent, les Sulfs pourraient avoir des activités pro- ou anti-tumorales, qui diffèreraient en fonction du type de cancer et de l'enzyme étudiée.

Partie 3: Fonctions associées à la 3-O-sulfatation des HS

1. Fonctions physiologiques associées à la 3-O-sulfatation

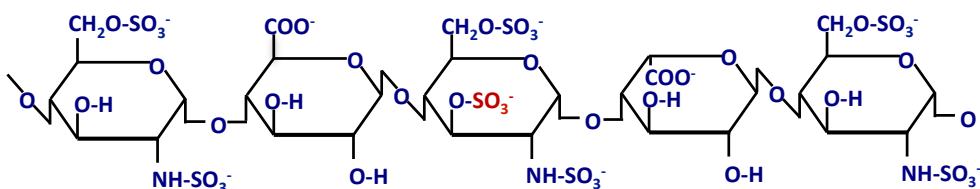
1.1. Rôle des héparanes 3-O-sulfatés dans l'activité de l'antithrombine-III

Les cellules endothéliales vasculaires produisent des HS anticoagulants, appelés HS^{AT+}, possédant un motif pentasaccharidique spécifique contenant un résidu de GlcN 3-O-sulfaté (Figure 14A). Il a été démontré que les 3-OST1 et 3-OST5 sont impliquées dans la génération de ces motifs dans l'héparine et les HS^{AT+} (Zhang *et al.*, 2001; Esko and Selleck, 2002). Les propriétés anticoagulantes de ces GAGs sont associées à leur capacité à fixer l'antithrombine-III (AT-III), une protéine appartenant à la famille des serpins (*serine protease inhibitor*), et impliquée dans la régulation de la cascade de coagulation. Il est maintenant établi que la fixation de l'AT-III sur les HS^{AT+} induit un changement de conformation de la protéine, lui permettant ainsi d'exercer son activité inhibitrice vis-à-vis des protéases de la cascade de coagulation, comme la thrombine ou le facteur Xa. En effet, l'interaction avec les HS^{AT+} expose une boucle réactive de l'AT-III impliquée dans la reconnaissance des protéases à sérine (Figure 14B). Des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier plusieurs résidus d'acides aminés basiques impliqués dans cette interaction, comme par exemple, les lysines 114 et 125 et l'arginine 129 (Schedin-Weiss *et al.*, 2002).

Le rôle anticoagulant des HS^{AT+} a été étudié dans divers processus physiologiques comme par exemple l'ovulation. En effet, un état fluide doit être maintenu avant l'ovulation, période pendant laquelle le follicule ovarien est en croissance. Ce maintien est essentiel afin de permettre l'acheminement des ovocytes des ovaires jusqu'à l'utérus. Ainsi, un mécanisme qui prévient la coagulation du fluide folliculaire doit être mis en place, et certains travaux suggèrent que ce processus soit médié par les cellules granuleuses ovariennes. Ces cellules ont la capacité de produire et de sécréter des HS^{AT+}, et leur stimulation par une hormone folliculo-stimulante augmente encore ce processus (Hosseini *et al.*, 1996). La production d'HS^{AT+} est également augmentée dans les follicules au stade pré-ovulatoire et décroît après l'ovulation. En outre, ces HS co-localisent au niveau des follicules avec l'AT-III, dont l'expression augmente également dans le fluide folliculaire. Ainsi, 50% des HS présents dans ce fluide sont des HS^{AT+} et présentent une très forte activité anticoagulante comparable à celle observée pour l'héparine. Cette activité a pu être corrélée à une forte expression de la 3-OST1 au niveau des cellules folliculaires (Princivalle *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2002; de Agostini *et al.*, 2008).

Les mécanismes impliquant l'activité anticoagulante des HS^{AT^+} sont observables lorsque ces structures sont retrouvées libres en solution. Toutefois, ni l'héparine ni les HS^{AT^+} ne sont retrouvés sous forme libre dans le sang. Les HS^{AT^+} sont exprimés à la surface des cellules endothéliales, mais principalement du côté basolatéral. Malgré le fait qu'ils ne soient pas en contact direct avec le fluide sanguin, l'hémostase est maintenue, suggérant que les HS^{AT^+} pourraient ne pas être essentiels à l'activité anticoagulante de l'AT-III. Par contre, ces derniers peuvent exercer cette activité lors d'une lésion de l'endothélium (Shworak *et al.*, 2010). De plus, les souris exprimant une forme mutée de l'AT-III, incapable de se fixer aux HS^{AT^+} , développent un phénomène de thrombose spontanée, ce qui prouve que ces structures agissent potentiellement en tant qu'anticoagulant (Dewerchin *et al.*, 2003).

A. Pentasaccharide d' HS^{AT^+} reconnu par l'AT-III



B. Changement conformationnel de l'AT-III induit par la fixation d'un pentasaccharide d' HS^{AT^+}

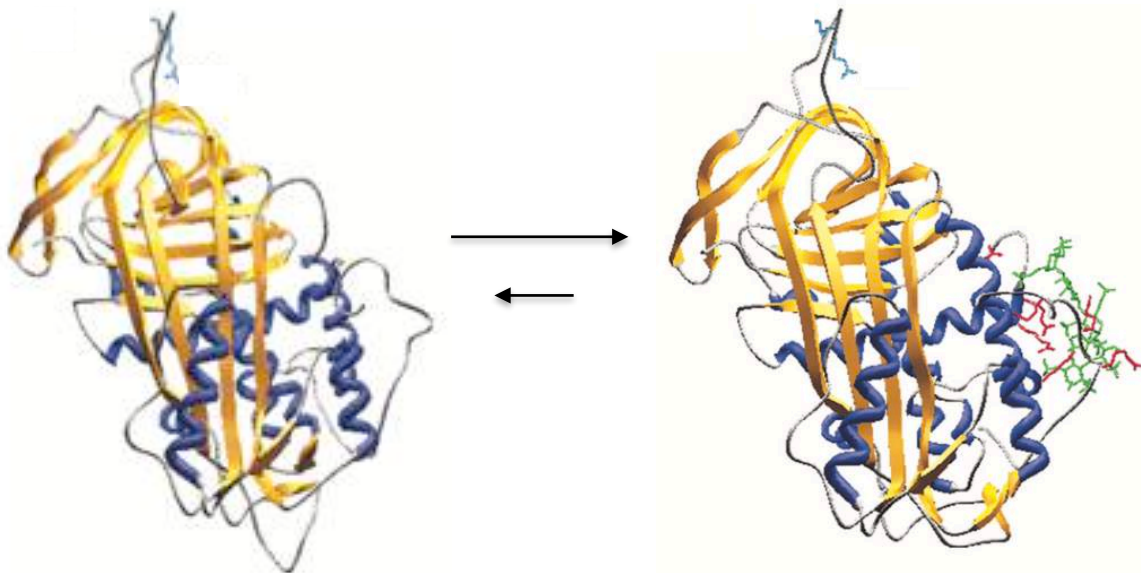


Figure 14: Spécificité de l'interaction entre l'antithrombine-III (AT-III) et le pentasaccharide des HS^{AT^+} . (A) Structure du pentasaccharide reconnu par l'AT-III. (B) La fixation du pentasaccharide spécifique (en vert) induit un changement de conformation de l'AT-III, ce qui permet l'interaction avec la thrombine et son inhibition. D'après Olson *et al.*, 2002b

Dans le but de confirmer le rôle biologique des HS^{AT^+} dans l'activité de l'AT-III, des souris invalidées pour la 3-OST1 ont été générées (Shworak *et al.*, 2002). De façon

surprenante, ces souris ne présentent pas de défaut de coagulation, bien que les HS isolés des tissus montrent une réduction importante de leur activité vis-à-vis du facteur Xa. Il a alors été suggéré que les HS^{AT+} 3-O-sulfatés ne soient pas essentiels à la fonction anticoagulante de l'AT et que cette fonction puisse être dispensée par d'autres structures HS (HajMohammadi *et al.*, 2003). Etant donné que les HS^{AT+} sont également exprimés par d'autres types cellulaires, tels que les cellules épithéliales, il a été suggéré qu'ils puissent jouer un autre rôle, notamment dans la modulation de l'activité anti-inflammatoire de l'AT (Girardin *et al.*, 2005; Shworak *et al.*, 2010).

De nombreuses données sont ainsi en faveur d'un rôle des HS^{AT+} dans l'activité anti-inflammatoire de l'AT-III. Plusieurs études ont en effet démontré un rôle protecteur de l'AT-III au cours des SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*), notamment lors des chocs septiques et hémorragiques et lors de syndrome de détresse respiratoire. Tous les SIRS impliquent une suractivation des leucocytes et des cellules endothéliales, ce qui accentue les processus de coagulation et de réponse inflammatoire. Un acteur majeur de l'initiation des SIRS est le TNF- α , qui par activation de la voie NF- κ B, induit la production de facteurs pro-inflammatoires et pro-coagulants comme le facteur tissulaire qui permet l'activation du facteur X impliqué dans la cascade de coagulation. La voie NF- κ B induit également l'expression de l'iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) qui augmente le niveau d'oxyde nitrique et mène ainsi au choc septique (Wiedermann *et al.*, 2002). Plusieurs études ont démontré que l'AT-III est capable de diminuer la réponse inflammatoire observée au cours des SIRS (Minnema *et al.*, 2000). En effet, il a été montré chez l'animal ainsi que sur des cellules endothéliales humaines en culture que la stimulation par l'AT-III induit la production de la prostacycline PGI₂, un inhibiteur de l'activation des leucocytes (Harada *et al.*, 1999; Hoffman and Faist, 2000). Il a également été montré que la production de PGI₂ induite par l'AT-III inhibe l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules endothéliales stimulées par le TNF- α (Oelschläger *et al.*, 2002). Dans le but de démontrer l'implication des HS^{AT+} dans la régulation de la réponse inflammatoire *in vivo*, la réponse au LPS a été analysée chez des souris invalidées pour la 3-OST1 (Shworak *et al.*, 2010). Ces souris montrent une forte diminution du taux de HS^{AT+} dans la plupart des organes. Elles présentent également un phénotype inflammatoire élevé qui se caractérise par une sensibilité accrue au LPS. En effet, le LPS est létal pour environ 60% des souris 3OST1^{-/-} contre seulement 30% des souris non modifiées. En outre, le prétraitement des souris avec l'AT-III augmente considérablement la survie des souris exprimant la 3-OST1 comparée à celles qui ne l'expriment pas, ce qui montre l'importance de la 3-O-sulfatation des HS dans l'activité anti-inflammatoire de l'AT-III. Enfin, chez le Rat, l'AT-III prévient le choc septique provoqué par la production d'iNOS. Ces effets sont abolis en présence d'héparine ainsi que par l'utilisation d'une forme mutée de l'AT-III qui ne lie pas l'héparine (Isobe *et al.*, 2002).

1.2. Rôle de la 3-O-sulfatation dans l'activité de la cyclophiline B

Les cyclophilines appartiennent à une famille de protéines initialement caractérisées par leur activité peptidyl-prolyl cis/trans isomérase et leur capacité à fixer un agent immunosuppresseur, la cyclosporine A. Elles sont retrouvées dans différents compartiments cellulaires et sous forme sécrétée. Ainsi, les cyclophilines A (CyPA) et B (CyPB) sont retrouvées dans plusieurs liquides biologiques et leur sécrétion peut être augmentée en réponse à des stimuli inflammatoires et à un stress oxydatif. Les formes sécrétées des CyPA et B induisent la migration des éosinophiles, des neutrophiles, des monocytes/macrophages et des lymphocytes T. Mais seule la CyPB est capable d'induire une adhérence ferme des cellules cibles à la matrice extracellulaire (Yurchenko *et al.*, 2001; Allain *et al.*, 2002; Yurchenko *et al.*, 2002; Melchior *et al.*, 2008). De plus, la CyPB semble être impliquée dans l'atténuation de la réponse des macrophages pro-inflammatoires puisqu'un prétraitement des macrophages par la CyPB inhibe la sécrétion de TNF- α induite par le LPS (Marcant *et al.*, 2012).

Des études visant à identifier les récepteurs fonctionnels de la CyPB sur ses cellules cibles ont mis en évidence l'intervention du CD147 et des chaînes HS portées par des protéoglycanes membranaires (Pakula *et al.*, 2007). En effet, l'élimination des HS membranaires par traitement aux héparinases des lymphocytes T issus de sang humain réduit considérablement la fixation de la CyPB (Denys *et al.*, 1998b). Des travaux se sont intéressés à la caractérisation de l'interaction entre la protéine et les chaînes HS. Ils ont démontré que la liaison s'effectue par l'intermédiaire de l'extrémité N-terminale de la protéine et que cette liaison est de forte affinité, avec un K_D de 16 nM (Mariller *et al.*, 1999 ; Denys *et al.* 1998b; Vanpouille *et al.*, 2007). De plus, des expériences de mutagenèse dirigée ont mis en évidence l'importance des lysines 3,4 et 5 (³KKK⁵) et du peptide ¹⁴YFD¹⁶ de la CyPB dans ces interactions, puisque les deux protéines mutées sont incapables de se fixer aux chaînes HS. Cette même étude a démontré que le motif HS minimal de fixation de la CyPB est un octasaccharide (Figure 15) (Vanpouille *et al.*, 2004).

Une autre étude a permis de démontrer que les chaînes HS impliquées dans la présentation de la CyPB et ses réponses cellulaires sont portées par le syndécan-1 (Pakula *et al.*, 2007). Bien que le CD147 et le syndécan-1 soient exprimés par un large panel de cellules, la CyPB n'induit pas de réponse cellulaire sur toutes les cellules, suggérant une spécificité d'interaction plus fine. Dans ce contexte, il a été démontré que la fixation de la CyPB sur les chaînes HS faisait intervenir un motif spécifique, contenant un résidu de glucosamine 3-O-sulfaté. L'inactivation de l'expression de la 3-OST3B inhibe la fixation et les réponses induites par la CyPB dans les lymphocytes T (Vanpouille *et al.*, 2007; Deligny *et al.*, 2010). Ainsi, l'expression des 3-OSTs impliquées dans la formation du motif de fixation

de la CyPB pourrait contrôler sa fixation sur ses cellules cibles et par conséquent réguler son activité au cours de la réponse inflammatoire.

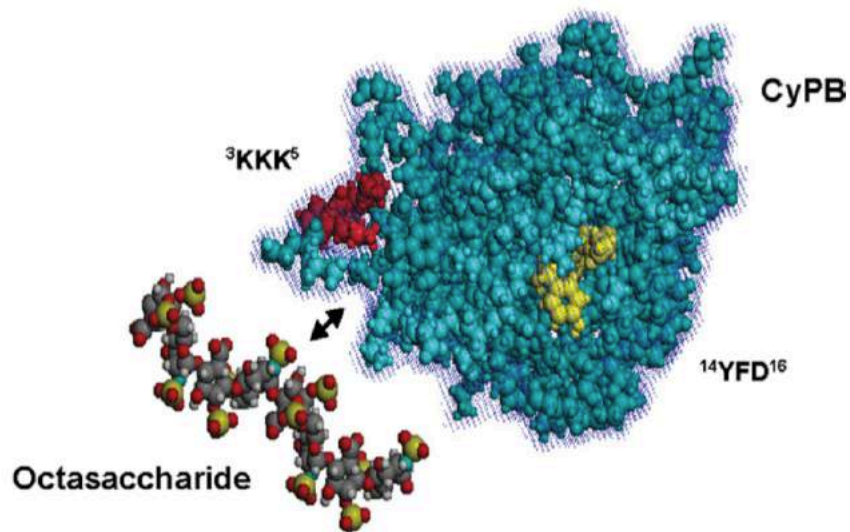


Figure 15: Modélisation moléculaire de la CyPB et d'un octasaccharide dérivé d'héparine. Les motifs KKK et YFD de la CyPB qui interagissent avec l'oligosaccharide, sont représentés en rouge et jaune, respectivement. D'après Vanpouille *et al.*, 2004.

1.3. Rôle de la 3-O-sulfatation dans le développement

A ce jour, peu d'études se sont intéressées au rôle de la 3-O-sulfatation lors du développement chez l'Homme. Toutefois, son implication a été mise en évidence au cours de plusieurs processus de développement chez d'autres organismes.

La Drosophile exprime deux 3-OSTs, nommées 3-OSTA et 3-OSTB. La 3-OSTA présente une forte homologie de séquence avec les 3-OSTs de type gD alors que la 3-OSTB est apparentée aux 3-OSTs de type AT. Deux études analysant le phénotype d'individus mutants pour l'une ou l'autre des 3-OSTs montrent des résultats contradictoires. En effet, les travaux de Kanimura *et al.* (2004), qui invalident la 3-OSTB en utilisant la méthode d'ARN interférence, montrent des atteintes neurologiques et un défaut de signalisation du récepteur Notch, en affectant sa stabilité et/ou son trafic intracellulaire. A l'inverse, Guo *et al.* (2014a) démontrent que les mutants pour la 3-OSTA ou la 3-OSTB sont viables et ne montrent ni atteinte neurologique, ni défaut de signalisation de Notch. Les mêmes résultats sont obtenus chez des individus où les deux enzymes sont invalidées. En revanche, ces auteurs ont mis en évidence l'importance des deux enzymes dans l'homéostasie intestinale. En effet, l'invalidation de 3-OSTA et/ou 3-OSTB dans les entérocytes induit une augmentation de la forme clivée de la caspase-3 ainsi qu'une augmentation de la prolifération des cellules souches intestinales par un mécanisme dépendant des voies de signalisation induites par l'EGFR (*Epidermal growth factor Receptor*). Ces observations suggèrent que les 3-OSTA et

3-OSTB sont des acteurs majeurs de l'homéostasie intestinale en contrôlant l'apoptose cellulaire et la prolifération des cellules souches (Guo *et al.*, 2014b).

Comme la Drosophile, *C.elegans* exprime deux 3-OSTs, nommées 3-OST1 et 3-OST2. La 3-OST1 présente une forte homologie de séquence avec les 3-OSTs de type AT alors que la 3-OST2 est apparentée aux 3-OSTs de type gD. L'analyse prédictive des séquences protéiques montre que la 3-OST1 est une protéine golgienne transmembranaire de type II tandis que la 3-OST2 serait une protéine sécrétée puisqu'elle ne posséderait pas de domaine transmembranaire. Les deux isoenzymes présentent une distribution tissulaire différente. Les études réalisées chez *C.elegans* ont mis en exergue un rôle des HS dans le développement neuronal (Bülow and Hobert, 2004; Bülow *et al.*, 2008; Kinnunen. 2014). Ce rôle a été plus précisément étudié par Teclé *et al.* (2013). La perte de fonction de l'une ou l'autre des 3-OSTs n'affecte pas la viabilité des organismes mais elle engendre un défaut au niveau du branchement axonal de certaines sous-populations neuronales. Seule la 3-OST2 participe au développement des branchements des interneurones AIY, en modulant l'expression de la protéine d'adhérence kal-1. Les auteurs considèrent kal-1 comme une HBP (*Heparin Binding Protein*) potentielle dont l'activité serait régulée par les héparanes 3-O-sulfatés. De plus, la réexpression de la 3-OST2 uniquement dans les interneurones AIY ne permet pas de restaurer le phénotype axonal, suggérant une implication des héparanes 3-O sulfatés des cellules au voisinage des interneurones AIY.

Plusieurs études se sont intéressées au rôle des 3-OSTs lors du développement chez le Poisson zèbre (*Danio rerio*), ce dernier possédant 8 isoenzymes différentes. Les travaux de Samson *et al.* (2013b) ont démontré l'implication de la 3-OST7 dans le développement cardiaque. En effet, l'invalidation de cette dernière entraîne une baisse de la contraction du muscle cardiaque et perturbe l'organisation de l'appareil contractile. Les effets sont corrélés à l'expression de BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*), puisqu'en condition normale, l'expression de cette protéine est restreinte à la jonction atrio-ventriculaire. En revanche, l'expression de BMP4 est plus étendue lorsque la 3-OST7 est invalidée, suggérant son implication dans le contrôle de la localisation de BMP4. Bien que d'autres membres de la famille des BMP aient été identifiés comme des HBP, par exemple BMP7, ces travaux sont les premiers à suggérer qu'une BMP soit régulée par la 3-O-sulfatation des HS (Irie *et al.*, 2003). Les effets sont spécifiques à la 3-OST7, puisque le phénotype n'est pas observé lors de l'invalidation de la 3-OST5 et 3-OST6. Une autre étude réalisée chez le Poisson zèbre a porté sur la mise en place de l'asymétrie gauche-droite au niveau des viscères. Une étape cruciale consiste en la formation d'un courant fluide asymétrique au niveau du nœud embryonnaire. Les cellules résidentes de ce nœud sont ciliées et mobiles, donnant ainsi naissance au courant fluide qui va influencer l'expression de nombreux gènes durant l'organogenèse. L'asymétrie gauche-droite du cœur, du cerveau et de l'intestin est contrôlée

par le flux liquidien et le mouvement des cils de l'épithélium composant la paroi des vésicules de Kupffer. Il a été démontré que deux 3-OSTs participent de manière indépendante au fonctionnement des cils dans les vésicules de Kupffer. Ainsi, l'invalidation de l'expression de la 3-OST5 entraîne une réduction de la longueur des cils, ce qui est associé à un défaut d'activation de facteurs de transcription ciliogéniques. Les auteurs suggèrent un mécanisme dépendant des voies de signalisation activées par le FGF-8, puisqu'ils avaient précédemment démontré son implication dans la modulation de l'expression de ces facteurs de transcription (Neugebauer *et al.*, 2009). La 3-OST6 est également impliquée dans l'asymétrie gauche-droite, en modulant un mécanisme différent de celui ciblé par la 3-OST5. En effet, la 3-OST6 contrôlerait la mobilité des cils en régulant l'expression de molécules motrices, et ainsi diminuerait le flux liquidien créé par les cellules résidentes des vésicules de Kupffer. Les autres 3-OSTs exprimées par ces mêmes cellules (3-OST3 et 3-OST7) ne compensent pas la perte de la 3-OST5 et 3-OST6, et leur invalidation génique ne provoque pas les défauts d'asymétrie gauche-droite. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent un rôle spécifique de chaque 3-OST exprimée dans ces cellules de part leur capacité à générer des héparanes 3-O-sulfatés différents avec des propriétés biologiques distinctes (Neugebauer *et al.*, 2013).

Les études réalisées chez la Souris montrent l'implication de la 3-O-sulfatation dans les mécanismes de prolifération et de différenciation des cellules souches. Des travaux précédents avaient démontré que le facteur LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) est un répresseur de la différenciation des cellules souches *via* un mécanisme dépendant de l'activation de STAT3 (*Signal Transduction and Activator of transcription 3*). Or, l'invalidation de LIF entraîne une différenciation des cellules souches murines, qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la 3-OST5. Les travaux de Hirano *et al.* (2012) ont également démontré une différenciation des cellules souches lorsque la 3-OST5 est surexprimée, même en présence du facteur LIF. Les auteurs suggèrent que la présence accrue d'héparanes 3-O-sulfatés à la surface cellulaire, générée par la surexpression de la 3-OST5, modulerait la signalisation cellulaire induite par Fas. Cependant, les mécanismes sous-jacents restent inconnus (Hirano *et al.*, 2013). Une autre étude chez la Souris a mis en évidence l'implication des 3-OST3s dans la prolifération de cellules progénitrices au cours de l'organogénèse. En effet, la signalisation cellulaire dépendante des récepteurs FGFR2b et KIT est importante pour la viabilité et la prolifération de ces cellules (Lombaert *et al.*, 2013). Les travaux de Patel *et al.* (2014) ont démontré que l'ajout d'oligosaccharides 3-O-sulfatés générés par les 3-OST3s entraîne une augmentation de la prolifération des cellules, de l'activation de la voie ERK/MAPK et de l'expression des 3-OST3s et du récepteur KIT. Les auteurs suggèrent un mécanisme autocrine dépendant des héparanes 3-O-sulfatés, qui contrôleraient la signalisation du FGFR2b au cours de l'organogénèse.

Enfin, une étude s'est intéressée aux variations d'expressions des enzymes de biosynthèse des GAGs au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules mésodermiques. Ils démontrent que la 3-OST1 est plus exprimée dans les cellules différenciées, alors que l'expression des 3-OST2 et 6 est fortement inhibée au cours du processus de différenciation (Gasimli *et al.*, 2014).

2. Fonctions pathologiques associées à la 3-O-sulfatation

2.1. Implication de la 3-O-sulfatation dans l'infection par HSV-1

Le processus d'infection de nombreux agents pathogènes, et plus particulièrement des virus, débute par la fixation d'au moins une protéine virale sur les HS situés à la surface de leurs cellules cibles. On peut notamment citer les virus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), HCV (*Hepatitis C Virus*), HPV (*Human Papilloma Virus*) ou encore HSV-1 et -2 (*Herpes Simplex Virus*) (Tiwari *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2016).

La fixation de HSV-1 sur ses cellules cibles fait intervenir des interactions entre des glycoprotéines de l'enveloppe virale et des molécules présentes à la surface de la cellule hôte. Cinq d'entre elles, les gB, gC, gH, gL et gD sont nécessaires à l'entrée du virus dans ses cellules cibles. En effet, les virions mutants pour l'une de ces cinq glycoprotéines sont incapables d'infecter leurs cellules cibles.

La première étape est l'attachement de HSV-1 à la surface des cellules. Elle est médiée par la fixation des glycoprotéines gB et/ou gC sur les HS (Spear *et al.*, 1992), par des interactions qui requièrent la présence de motifs 2-O- et 6-O-sulfatés (Feyzi *et al.*, 1997 ; Laquerre *et al.*, 1998).

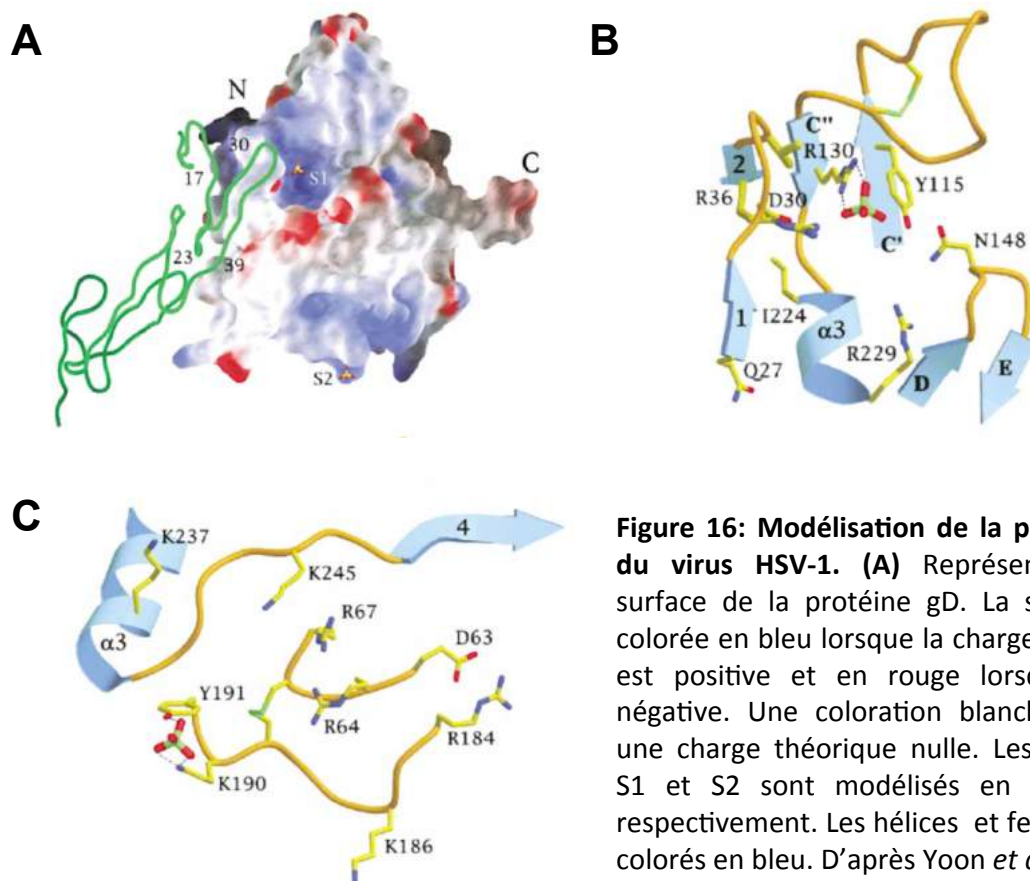
L'attachement du virus est suivi de l'étape de fusion membranaire, qui nécessite l'intervention de la glycoprotéine gD. Cette protéine peut interagir avec des motifs HS contenant une GlcN 3-O-sulfatée. En effet, les travaux de Shukla *et al.* (1999) ont mis en exergue ce mécanisme, puisque l'expression spécifique des 3-OST3A et 3-OST3B dans des cellules CHO, normalement résistantes à l'infection, est suffisante pour induire la fusion membranaire avec des cellules exprimant les glycoprotéines virales. La même stratégie fut utilisée pour permettre l'identification des 3-OST2, 3-OST4, 3-OST5 et 3-OST6 comme des enzymes capables de générer un motif HS 3-O-sulfaté conférant une sensibilité des cellules CHO à l'infection par HSV-1 (Xia *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2006).

Par la suite, une forme recombinante de la protéine gD a été utilisée pour purifier des oligosaccharides 3-O-sulfatés dans le but de caractériser le motif HS de fixation. La structure retenue est un octasaccharide possédant un résidu de GlcNH₂ 3-O-sulfatée et dont la séquence est: IdoUA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNAc-UA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNH₂3S6S (Liu

et al., 2002). Deux études se sont intéressées à la caractérisation du site de fixation des héparanes 3-O-sulfatés sur la protéine gD en utilisant des approches différentes. Dans la première, Carfi *et al.* (2001) ont réalisé une modélisation moléculaire à partir de cristaux de la protéine gD réalisés en présence de sulfate d'ammonium. La représentation de surface de la protéine gD identifie deux domaines chargés positivement, nommés S1 et S2 (Figure 16 A). Les auteurs suggèrent que ces deux domaines puissent être des sites putatifs de fixation pour des ions sulfates. La poche S1, située dans la région N-terminale de la protéine, est formée par les feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$ de la protéine (résidus 28 à 36) et les feuillets C', D et E du domaine Ig. De plus, elle contient des acides aminés basiques, comme l'arginine 130 qui établit deux ponts hydrogènes avec le groupement sulfate, mais aussi deux autres arginines et deux lysines (Figure 16B). Le domaine S2 est plus en surface que la poche S1 et contient aussi des acides aminés basiques, notamment la lysine 190 qui établit deux ponts hydrogènes avec le groupement sulfate, mais également deux autres lysines et trois arginines (Figure 16C). Toutefois, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée pour confirmer ces données obtenues *in silico*. La seconde étude démontre que l'activité de la protéine gD dépend de son domaine N-terminal. En effet, la délétion des acides aminés 7 à 32 réduit considérablement la fusion membranaire entre des cellules exprimant la glycoprotéine virale et des cellules CHO exprimant la 3-OST3B (Yoon *et al.*, 2003).

L'interaction entre les héparanes 3-O-sulfatés et la gD est nécessaire pour l'entrée du virus dans les fibroblastes et les cellules hématopoïétiques. En effet, l'élimination des HS par un traitement avec des héparinases réduit considérablement l'entrée du virus dans les deux types cellulaires (Tiwari *et al.*, 2006; Choudhary *et al.*, 2011; Tiwari *et al.*, 2011). L'utilisation d'oligosaccharides 3-O-sulfatés, obtenus par sulfatation *in vitro* de fragments d'héparine ou de HS avec des formes recombinantes de 3-OST3A ou de 3-OST5, entraîne les mêmes effets, alors que ceux modifiés par la 3-OST1 sont incapables d'inhiber l'entrée du virus. (Tiwari *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2010). Dans ce contexte, Copeland *et al.* (2008) suggèrent l'utilisation d'octasaccharides 3-O-sulfatés comme thérapie potentielle contre l'infection par HSV-1.

En plus de leur implication dans le processus d'internalisation du virus, les héparanes 3-O-sulfatés joueraient également un rôle dans la formation des polykaryocytes suite à l'infection virale. Les polykaryocytes sont formés par la fusion entre des cellules infectées exprimant des protéines virales et des cellules non infectées, ce qui permet l'expansion du virus. Les travaux de Tiwari *et al.* (2007) ont démontré que les cinq glycoprotéines virales impliquées dans la fusion membranaire (gB, gC, gH, gL et gD) sont nécessaires à la formation des polykaryocytes, et que les héparanes 3-O-sulfatés présents sur les cellules saines co-localisent avec la protéine gD présente sur les cellules infectées lors de ce processus, ce qui provoque la fusion membranaire.



2.2. Implication de la 3-O-sulfatation dans les processus cancéreux

Depuis de nombreuses années, des études ont démontré que le processus de cancérisation est accompagné de modifications du profil d'expression des protéoglycanes mais aussi des altérations des chaînes HS portées par ces derniers. Elles sont le résultat de nombreux remodelages des mécanismes génétiques et épigénétiques, ce qui affecte, entre autres, les enzymes de biosynthèse des HS (Sasisekharan *et al.*, 2002). Ainsi, l'expression des co-polymérase EXT1/2 est réduite dans de nombreux cancers et s'accompagne du maintien de certains protéoglycanes, tels que le syndécan-2 ou le CD44-v3, dans des compartiments intracellulaires. Les auteurs considèrent même ces deux enzymes comme des suppresseurs de tumeurs (Hameetman *et al.*, 2007; Schrage *et al.*, 2009). A l'inverse, d'autres études montrent que certaines enzymes de maturation des HS sont surexprimées, comme la 6-OST2 dans les cancers colorectaux et la 2-OST dans le cancer du pancréas (Ferguson and Datta, 2011; Hatabe *et al.*, 2013).

Outre les mécanismes intrinsèques aux cellules cancéreuses, l'environnement tumoral est en capacité de modifier la biosynthèse des HS, notamment par la production de facteurs par les leucocytes infiltrés ou par les cellules cancéreuses elles-mêmes. En effet, une étude a montré que les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IFN- γ modifient

l'expression des enzymes de biosynthèse des HS, mais les signaux intracellulaires et mécanismes moléculaires à l'origine de ces variations d'expression demeurent encore inconnus (Klein *et al.*, 1992). En outre, l'environnement tumoral est dépendant de l'état d'avancement et du type de cancer, ce qui se caractérise par une production variable en cytokines et facteurs de croissance. De ce fait, la structure des HS subit de profonds remodelages au cours du temps qui vont entraîner la modification du phénotype prolifératif et invasif des cellules cancéreuses (Ferguson and Datta, 2011; Afratis *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont montré que les 3-OSTs sont peu exprimées voire même totalement absentes des cellules cancéreuses. Ainsi, une hyperméthylation d'îlots CpG situés au niveau du promoteur du gène *hs3st2* codant pour la 3-OST2 est retrouvée dans de nombreux cancers, ce qui entraîne une augmentation de la prolifération et des capacités migratoires des cellules épithéliales cancéreuses (Miyamoto *et al.*, 2003; Bui *et al.*, 2010). L'étude menée par Bui *et al.* (2010) a également montré une hyperméthylation au niveau des promoteurs des gènes *hs3st1*, *hs3st3A1* et *hs3st6* codant respectivement pour les 3-OST1, 3A et 6 dans des cellules épithéliales de chondrosarcome. Le traitement des cellules avec la 5-aza-2'-desoxycytidine, un inhibiteur spécifique des ADN méthyltransférases, restaure l'expression des 3-OSTs et entraîne une diminution de la prolifération et des capacités invasives des cellules mais augmente leur adhérence. Il a donc été suggéré que l'inhibition d'expression des 3-OSTs pourrait être associée au développement tumoral.

Toutefois, des études plus récentes sont en contradiction avec les résultats obtenus dans ces études précédentes et suggèrent que les héparanes 3-O-sulfatés participeraient à la progression de la pathologie. De manière surprenante, Vijaya Kumar *et al.* (2014) ont démontré que la surexpression de la 3-OST2 en cellules épithéliales mammaires MDA-MB-231 augmente les capacités migratoires et la viabilité des cellules. Des travaux ont également suggéré un rôle pro-tumoral de la 3-OST3B. En effet, la surexpression de cette isoenzyme induit la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses pancréatiques (Song *et al.*, 2011). Une autre étude a montré que la surexpression de la 3-OST3B en cellules leucémiques entraîne une augmentation de la viabilité et des capacités migratoires *in vitro* et favorise l'angiogenèse et la croissance des tumeurs *in vivo* via une augmentation de la synthèse du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et de l'activation des voies de signalisation associées à ce facteur de croissance (Zhang *et al.*, 2015). Enfin, Mao *et al.* (2016) ont montré que la 3-OST3A exerce une fonction différente dans les cellules de cancer du sein, qui serait dépendante du contexte tumoral. En effet, le promoteur du gène *hs3st3A1* codant pour la 3-OST3A est hyperméthylé dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. L'enzyme aurait une fonction de suppresseur de tumeur en affectant les réponses cellulaires induites par l'interaction entre le FGF-7 et le FGFR2b. A l'inverse, la 3-OST3A exerce un rôle pro-tumoral *in vitro* et *in vivo* au niveau de tumeurs

mammaires HER2+ (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) et demeure un marqueur de mauvais pronostic.

Des travaux ont également montré une implication des héparanes 3-O-sulfatés portés par les cellules cancéreuses dans leur échappement au système immunitaire. En effet, Biroccio *et al.* (2013) ont démontré que la surexpression de la 3-OST4 favorise la prolifération des cellules cancéreuses *in vivo*, en réduisant le recrutement et l'activation des cellules *Natural Killer* (NK) au niveau de la tumeur. Cette enzyme, normalement exprimée au niveau cérébral et à l'état embryonnaire, est de nouveau exprimée par les cellules cancéreuses sous le contrôle de TRF2 (*Telomeric repeat-binding factor 2*), une protéine impliquée dans la protection des télomères mais pouvant aussi exercer la fonction de facteur de transcription. Toutefois, les mécanismes sous-jacents restent à ce jour inconnus. Cette étude suggère ainsi que les cellules cancéreuses pourraient modifier la structure de leur chaînes HS afin d'échapper de manière plus efficace au système immunitaire. De même, il a été suggéré que l'activité des cellules NK peut être modulée par les héparanes 3-O-sulfatés, dont la synthèse serait dépendante de l'expression de la 3-OST3B dans les cellules cibles (Brusilovsky *et al.*, 2013). Par conséquent, les héparanes 3-O-sulfatés présents à la surface des cellules cancéreuses pourraient bloquer des signaux activateurs des cellules NK en empêchant l'interaction avec des récepteurs tels que NKp30 et NKp46 ou à l'inverse, favoriser des signaux inhibiteurs, notamment *via* certains membres de la famille des récepteurs KIR (*Killer cell Ig-like Receptor*) (Faure and Long, 2002; Vivier and Anfosi, 2004).

2.3 Implication de la 3-O-sulfatation dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une tauopathie, qui se caractérise par une hyperphosphorylation de la protéine Tau. Ce mécanisme conduit à l'agrégation des protéines Tau et par conséquent à la déstabilisation des microtubules entraînant une dégénérescence neurofibrillaire, et à terme la mort de la cellule nerveuse. Les travaux de Sepulveda-Diaz *et al.* (2015) ont porté sur les variations d'expression des enzymes de biosynthèse des HS chez des patients atteints de la maladie. Les auteurs ont ainsi mis en évidence une augmentation de l'expression des 3-OST2 et 3-OST4 dans l'hippocampe chez les individus malades. De plus, ils ont démontré que les héparanes 3-O-sulfatés interagissent avec Tau à l'intérieur de la cellule en condition pathologique, et participent à la phosphorylation anormale de la protéine. Enfin, cette étude a montré que l'inhibition de l'expression du gène *hs3st2* dans un modèle de tauopathie chez le Poisson zèbre restaure le profil de phosphorylation de Tau dans le cerveau et la moelle épinière, assurant ainsi l'intégrité et la motilité des motoneurones. Les héparanes 3-O-sulfatés, en particulier ceux générés par l'action de la 3-OST2, auraient donc un rôle critique dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer se caractérise également par la formation de plaques amyloïdes formées par l'accumulation de peptides A β . Il a été démontré que les HS jouent un rôle important dans la formation de ces plaques et la fibrillogénèse des peptides A β , et que les effets sont dépendants de leur taux de sulfatation. En effet, la fibrillogénèse est exacerbée en présence de HS fortement sulfatés et à l'inverse, la formation de fibres amyloïdes est moins prononcée en présence de HS non sulfatés (Castillo *et al.*, 1999). Dans ce contexte, Bruinsma *et al.* (2010) ont étudié la distribution d'anticorps anti-HS reconnaissant des épitopes différemment sulfatés au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral de patients atteints de la maladie. Ils ont montré qu'un anticorps reconnaissant les épitopes 3-O-sulfatés se fixait fortement au niveau de ces deux régions cérébrales, suggérant ainsi que cette modification est importante au cours de la formation des plaques amyloïdes. Par la suite, une étude a montré une augmentation de la quantité d'HS dans l'hippocampe au cours du vieillissement, associée à une modification de l'expression de leurs enzymes de biosynthèse. En outre, l'expression de la 3-OST4 est augmentée alors que celle de la 3-OST5 est diminuée, ce qui suggère la présence de motifs 3-O-sulfatés différents chez les individus jeunes comparativement aux individus âgés (Huynh *et al.*, 2012).

Travaux Personnels

Partie 1: Participation des héparanes 3-O sulfatés dans les propriétés anti-apoptotiques de la glycoprotéine gD du virus HSV-1 et de la cyclophiline B

1. Introduction

1.1. Généralités sur HSV-1

HSV-1 est un virus à ADN double brin de la famille des *Herpesviridae* majoritairement à l'origine de l'herpès labial. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 67% de la population mondiale est infectée par le virus. Lors de la primo-infection, HSV-1 cible les cellules épithéliales au niveau des muqueuses. Le virus établit ensuite une phase de latence en se réfugiant au niveau cérébral dans les ganglions trigéminaux. Cet état latent peut être interrompu par des récurrences herpétiques en réponse à un stress physique ou psychologique (Shukla *et al.*, 2012). Bien que les cellules épithéliales soient ses cibles privilégiées, HSV-1 possède un tropisme d'infection plus large et peut être à l'origine de complications neurologiques et oculaires chez les nourrissons et les individus immunodéprimés (Kopp *et al.*, 2009; Karasneh and Shukla, 2011). Les atteintes oculaires sont la cause principale de cécité dans les pays développés. Elles sont dues à une prolifération des fibroblastes et au recrutement des cellules inflammatoires, plus particulièrement les macrophages, ce qui provoque des kératites oculaires et un état inflammatoire chronique (Kaye and Choudhary, 2006). A ce jour, il n'existe aucun traitement pour guérir l'infection. Les médicaments antiviraux utilisés, par exemple l'Acyclovir, servent uniquement à réduire la gravité et la fréquence des symptômes liés à l'infection.

Le processus d'infection de HSV-1 se déroule en deux phases. Premièrement, la fixation de HSV-1 sur ses cellules cibles fait intervenir des interactions entre des glycoprotéines de l'enveloppe virale (gB, gC, gH et gL) et des molécules présentes à la surface de la cellule hôte, telles que les chaînes HS et les intégrines. La fixation du virus est suivie de l'étape de fusion membranaire, qui nécessite l'intervention de la glycoprotéine gD. Cette protéine peut interagir avec quatre récepteurs différents selon la cellule cible : HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), un membre de la famille des récepteurs du TNF- α , les nectines-1 et -2, des molécules d'adhérence de la famille des immunoglobulines, et des héparanes 3-O-sulfatés (Figure 17) (Shukla *et al.*, 1999; Spear, 2004). Des études ont mis en évidence une importance relative des différents récepteurs de la protéine gD selon le type cellulaire. Ainsi, la seule présence de la nectine-1 est suffisante à la protéine gD pour induire la fusion membranaire et l'entrée de HSV-1 dans les cellules épithéliales et neuronales (Tiwari *et al.*, 2008; Kopp *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2012). En revanche, l'interaction entre les héparanes 3-O-sulfatés et la gD est nécessaire pour l'entrée du virus dans les

fibroblastes et les cellules hématopoïétiques, et ceci malgré l'expression de la nectine-2 et de HVEM. En effet, l'élimination des HS par un traitement des cellules avec des héparinases réduit considérablement l'entrée du virus dans les deux types cellulaires (Shukla *et al.*, 1999; Tiwari *et al.*, 2006; Choudhary *et al.*, 2011).

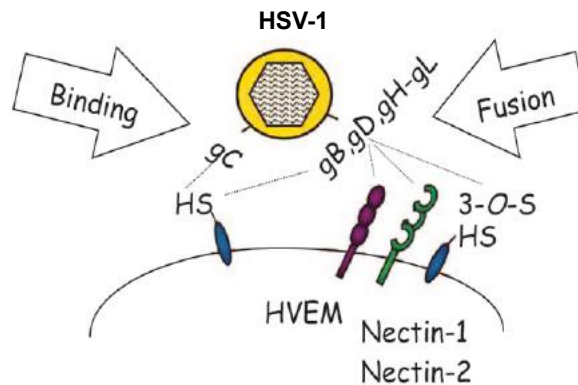


Figure 17 : Interaction HSV-1 / cellules cibles. D'après Spear (2004).

1.2. Processus apoptotiques liés à HSV-1

1.2.1 Généralités sur l'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique hautement régulé indispensable au développement embryonnaire et au maintien de l'homéostasie tissulaire. D'un point de vue morphologique, l'apoptose se caractérise par une diminution progressive du volume cellulaire avec condensation de la chromatine, suivie d'une fragmentation caractéristique de l'ADN qui aboutit à la formation de corps apoptotiques. Ces derniers sont ensuite phagocytés, majoritairement par les macrophages.

Le processus apoptotiques peut être déclenché par deux voies distinctes : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Figure 18) (Sun *et al.*, 1999). La voie extrinsèque est initiée par la fixation de ligands pro-apoptotiques, tels que FasL et TNF- α , sur leurs récepteurs cellulaires, Fas et TNFR1 respectivement. Cette interaction entraîne la formation d'un complexe de signalisation qui conduit à l'activation de protéases appelées caspases. Ces dernières appartiennent à une classe de protéases à cystéines, synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, les pro-caspases, qui seront ensuite activées par clivage protéolytique. Les premières caspases activées sont les caspases initiatrices, telles que les caspase-8 et -10. La cascade d'activation se poursuit par l'activation des caspases effectrices, notamment les caspase-3 et -7. A ce stade, le processus apoptotique est irréversible et les caractéristiques morphologiques de l'apoptose apparaissent (Nagata, 1997; Lavrik *et al.*, 2005). La caspase-8 activée peut également engager la voie intrinsèque de l'apoptose par l'intermédiaire du clivage de la protéine Bid en t-Bid. La voie intrinsèque de

l'apoptose, appelée également voie mitochondriale, est initiée le plus souvent par des stimuli intracellulaires (Wang, 2001). Sous l'influence de ces signaux, la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie est altérée par des protéines de la famille de Bcl-2 (*B-cell Lymphoma*) (Czabotar *et al.*, 2014). Cette famille comporte des protéines pro-apoptotiques, notamment Bid, Bad, Bax, et Bcl-XS, et des protéines anti-apoptotiques, par exemple Bcl-2 et Bcl-XL. La caractéristique importante des membres de cette famille est la capacité à former des homo- ou des hétéro-dimères. L'équilibre entre la vie ou la mort de la cellule est influencé par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques (Oltvai *et al.*, 1993). Ainsi, la formation majoritaire de dimères anti-apoptotiques conduit à la survie cellulaire, alors que la présence accrue de dimères pro-apoptotiques mène vers le processus apoptotique. La proportion de chaque type de dimères dépend de l'expression et de la localisation de ces protéines, de leur niveau de phosphorylation ou encore de clivages protéolytiques. Les membres de la famille Bcl-2 régulent l'apoptose par le contrôle de la fuite mitochondriale du cytochrome C (Dejean *et al.*, 2006; Czabotar *et al.*, 2014). L'augmentation de la concentration en cytochrome C dans le cytoplasme entraîne son association avec APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*) et la pro-caspase-9 au sein d'un complexe appelé apoptosome, ce qui active la caspase-9. Comme pour la caspase-8, la caspase-9 clivée active les caspases effectrices, aboutissant à l'apoptose de la cellule (Li *et al.*, 1997; Dejean *et al.*, 2006).

1.2.2. Réponses anti-apoptotiques induites par HSV-1

L'apoptose est considérée comme un processus mis en place par les cellules hôtes afin de lutter contre l'infection virale. En effet, l'élimination des cellules infectées par apoptose limite à la fois les mécanismes de réplication et de propagation du virus. Il n'est donc pas surprenant que HSV-1 développe des mécanismes d'évasion contre l'apoptose. Plusieurs études ont démontré que des protéines de l'enveloppe de HSV-1 sont en capacité d'induire des réponses anti-apoptotiques au sein de la cellule hôte (Figure 18). Ainsi, il a été montré que la glycoprotéine gD protège la lignée myéloïde U937 contre l'apoptose induite par un anticorps anti-Fas et par la staurosporine (Medici *et al.*, 2003 ; Sciortino *et al.*, 2008). De plus, une étude transcriptomique réalisée à partir de fibroblastes humains primaires a mis en évidence une augmentation de l'expression de Bcl-2, Bcl-xL dans les cellules infectées, par un mécanisme dépendant de l'interaction entre la gD et HVEM (MacLeod and Minson, 2010). Une autre protéine de l'enveloppe de HSV-1, la glycoprotéine gJ, a été décrite pour induire des réponses anti-apoptotiques. En effet, des virions déficients pour la protéine gJ sont dans l'incapacité de protéger les cellules hôtes contre l'apoptose induite par Fas (Jerome *et al.*, 2001). Il a également été montré que d'autres protéines synthétisées par le virus sont capables d'induire des réponses anti-apoptotiques (Figure 18). Ainsi, la

surexpression de Us3, une protéine à activité sérine/thréonine kinase, est capable de phosphoryler les protéines pro-apoptotiques Bid et Bad, ce qui inhibe leur activité. Par conséquent, une diminution de la concentration du cytochrome C dans le cytoplasme est observée, ce qui réduit fortement la formation de l'apoptosome et par conséquent la cascade d'activation des caspases (Munger *et al.*, 2001; Cartier *et al.*, 2003). Au cours de son processus de latence, HSV-1 met en place des mécanismes qui protègent les neurones contre l'apoptose. Dans ce contexte, des études ont démontré que l'expression des LATs (*Latency-Associated Transcripts*) par le virus protège *in vitro* et *in vivo* les cellules neuronales. Ainsi, la surexpression des LATs entraîne une diminution du clivage des caspase-8 et -9 (Perning *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 2002). L'ensemble de ces travaux montre que le virus HSV-1 est dans la capacité de moduler les deux voies menant à l'apoptose lors du processus d'infection mais également au cours de la phase de latence.

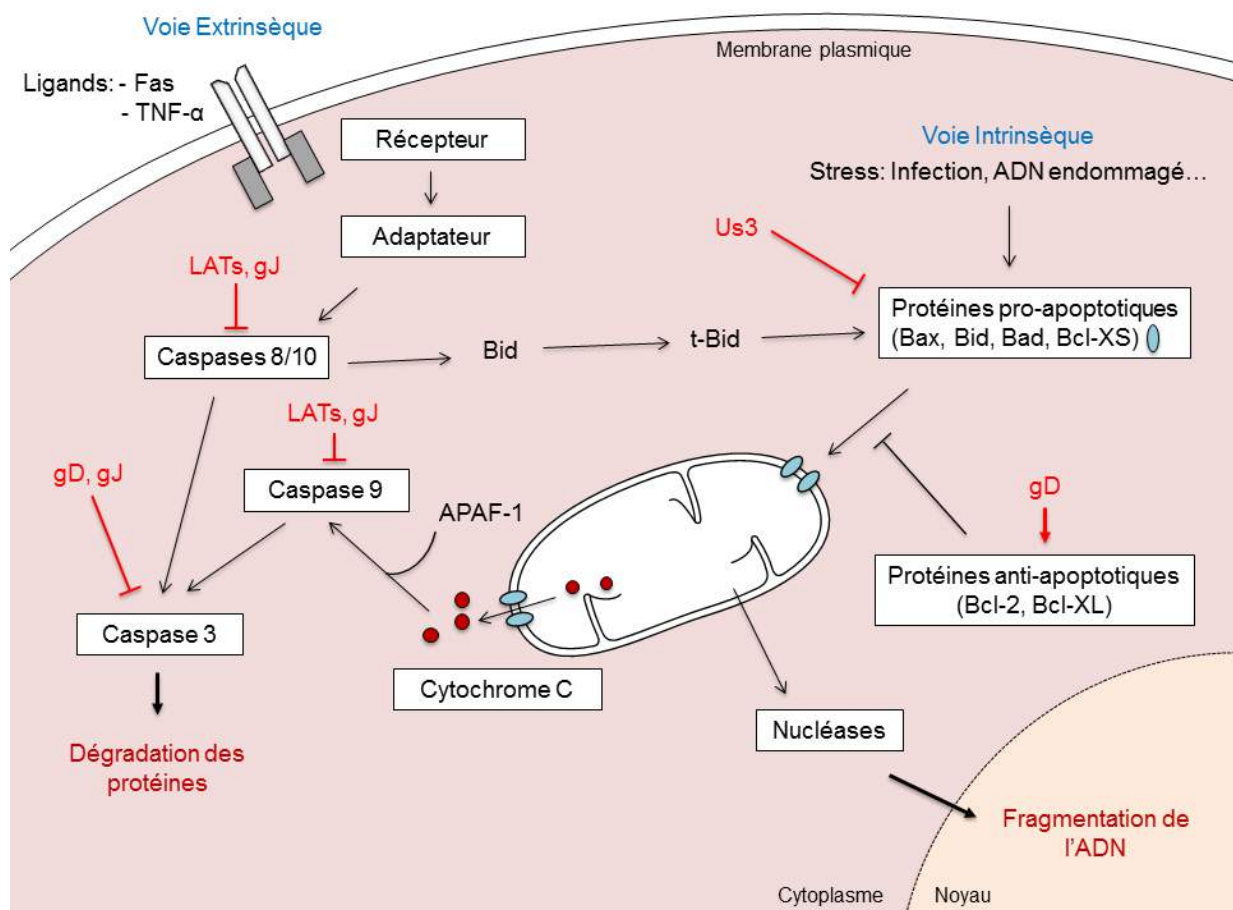


Figure 18: Modulation de l'apoptose par le virus HSV-1. Les protéines de la cellule hôte intervenant dans les processus apoptotiques sont représentées en noir. Les protéines virales modulant l'apoptose sont représentées en rouge. D'après Yu and He (2016).

2. Travaux de recherche

Comme nous l'avons vu précédemment, une forme soluble de la protéine gD est en capacité de protéger les cellules myéloïdes contre l'apoptose (Medici *et al.*, 2003; Sciortino *et al.*, 2008). Des travaux récents réalisés au Laboratoire ont démontré que les réponses pro-inflammatoires des macrophages primaires sont atténuées en présence de cyclophiline B (CyPB), un autre ligand connu des héparanes 3-O-sulfatés (Vanpouille *et al.*, 2007; Marcant *et al.*, 2012).

Ces observations nous ont conduit, dans un premier temps, à vérifier si ces deux ligands des héparanes 3-O-sulfatés peuvent induire les mêmes réponses anti-apoptotiques dans les macrophages primaires humains. Après avoir démontré que les deux protéines entrent en compétition pour se fixer à la surface des macrophages, nous avons étudié leur capacité à protéger les macrophages primaires contre l'apoptose induite par la staurosporine, puis nous avons vérifié si les héparanes 3-O-sulfatés participent à ces propriétés anti-apoptotiques.

Les résultats sont présentés dans l'article : « **Participation of 3-O-sulfated heparan sulfates in the protection of macrophages by herpes simplex virus-1 glycoprotein D and cyclophilin B against apoptosis** », accepté dans *FEBS Open Bio*.

3. Publication

“Participation of 3-O-sulfated heparan sulfates in the protection of macrophages by herpes simplex virus-1 glycoprotein D and cyclophilin B against apoptosis”

Maxime Delos, Charles Hellec, François Foulquier, Mathieu Carpentier, Fabrice Allain and Agnès Denys¹

University of Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France

¹Correspondence: Agnès Denys, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; Tel: +33-3-20-33-72-39; Fax: +33-3-20-43-65-55; e-mail: agnes.denys@univ-lille1.fr

Abbreviations: AT-III, antithrombin-III; CyPB, cyclophilin B; ERK, extracellular signal-regulated kinases; FCS, foetal calf serum; gD, glycoprotein D; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GlcUA, glucuronic acid; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; HS, heparan sulfates; HVEM, herpes virus entry mediator, HSV-1, herpes simplex virus-1; IdoUA, L-iduronic acid; NDST, *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase; NF- κ B, nuclear factor-*kappa* B; 2-OST, 2-*O*-sulfotransferase; 3-OST, 3-*O*-sulfotransferase; 6-OST, 6-*O*-sulfotransferase; PI, propidium iodide; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; siRNA, small-interfering RNA, TBS, Tris buffer saline.

Keywords: heparan sulfates, HSV-1 glycoprotein D, cyclophilin, apoptosis, macrophages

Abstract

Heparan sulfates (HS) are involved in numerous biological processes, which rely on their ability to interact with a large panel of proteins. Although the reaction of 3-O-sulfation can be catalysed by the largest family of HS sulfotransferases, very few mechanisms have been associated with this modification and to date, only glycoprotein gD of herpes simplex virus-1 (HSV-1 gD) and cyclophilin B (CyPB) have been well-described as ligands for 3-O-sulfated HS. Here, we hypothesized that both ligands could induce the same responses *via* a mechanism dependent on 3-O-sulfated HS. First, we checked that HSV-1 gD was as efficient as CyPB to induce the activation of the same signalling events in primary macrophages. We then demonstrated that both ligands efficiently reduced staurosporin-induced apoptosis and modulated the expression of apoptotic genes. In addition to 3-O-sulfated HS, HSV-1 gD was reported to interact with other receptors, including HVEM, nectin-1 and -2. Thus, we decided to identify the contribution of each binding site in the responses triggered by HSV-1 gD and CyPB. We found that knock-down of 3-O-sulfotransferase 2, which is the main 3-O-sulfated HS generating enzyme in macrophages, strongly reduced the responses induced by both ligands. Moreover, silencing the expression of HVEM rendered macrophages unresponsive to either HSV-1 gD and CyPB, thus indicating that both proteins induced the same responses by interacting with a complex formed by 3-O-sulfated HS and HVEM. Collectively, our results suggest that HSV-1 might hijack the binding sites for CyPB in order to protect macrophages against apoptosis for efficient infection.

Introduction

Heparan sulfates (HS) are sulfated polysaccharides composed of alternating glucosamine (GlcN) and uronic acid (GlcUA/IdoUA) residues. These repeating disaccharide units are clustered in a series of domains of relatively high IdoUA content and sulfate density (NS domains), bound by short transition zones with intermediate sulfation patterns and separated by *N*-acetylated domains (NA domains). HS are involved in a plethora of biological processes, which rely on their ability to selectively interact with a large panel of proteins [1,2]. HS-protein interactions are mainly dependent on the density and position of sulfate groups into the HS structure, which result in sequential actions of many HS biosynthetic enzymes. HS are initially synthesized as a linear polymer composed of alternating GlcUA and *N*-acetyl GlcN (GlcNAc) units, which is then subjected to enzymatic modifications in the Golgi apparatus. In the stepwise scheme of HS biosynthesis, the precursor is first subject to the action of *N*-deacetylases/*N*-sulfotransferases (NDSTs), which convert GlcNAc to *N*-sulfated GlcN (GlcNS) residues. This crucial reaction creates the prerequisite substrates needed for the next enzymatic modifications. The further modifications include C5-epimerization of some GlcUA into IdoUA residues and 2-*O*-sulfation of uronic acid residues. These steps are catalysed respectively by C5-epimerase and 2-*O*-sulfotransferase (2-OST). The latter introduces a sulfate group in position 2 of mainly IdoUA and rarely GlcUA. Finally, the reactions catalysed by 6-*O*-sulfotransferases (6-OSTs) and 3-*O*-sulfotransferases (3-OSTs) consist in the addition of sulfate groups to the 6-OH and 3-OH positions of GlcN residues respectively [1,3,4]. Importantly, NDSTs, 6-OSTs and 3-OSTs are represented by distinct isoenzymes, which exhibit fine differences in substrate specificity and for which the expression is dependent on cell type and tissue environment. For example, the 3-OST family is represented by seven isoenzymes in human (3-OST1, 2, 3A, 3B, 4, 5 and 6), which possess more than 60 % of sequence homology in the sulfotransferase domain. While 3-OST1 was reported to generate an HS binding site for antithrombin-III, 3-OST2, 3A, 3B, 4 and 6 transfer sulfate groups to the 3-OH position of GlcNS or GlcNH₂ adjacent to an IdoUA₂S residue, thus providing HS-binding sites for the glycoprotein D (gD) of herpes simplex virus-1 (HSV-1). In contrast, 3-OST5 exhibits broad substrate specificity and generate both HS-binding motifs [5-9].

Although the reaction of 3-*O*-sulfation can be catalysed by the largest family of HS sulfotransferases, it is the least abundant modification in HS, and to date, very few biological mechanisms have been reported to be dependent on 3-*O*-sulfated HS [10]. HSV-1 gD was the first protein described as a specific ligand for highly sulfated HS motifs containing 3-*O*-sulfated GlcN residue. In addition to 3-*O*-sulfated HS, HSV-1 gD was also reported to interact with other receptors, including nectin-1 and -2, two cellular adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, and HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), which belongs to the

TNF- α receptor superfamily [5,11]. Depending on the cell type, one or more receptors are critically required for the virus entry into host cells. For example, interaction between HSV-1 gD and 3-O-sulfated HS is necessary to promote the membrane fusion process allowing the virus to enter into fibroblasts and hematopoietic cells, even though HVEM and nectin-2 are also present at cell surface [5,12,13]. In contrast, the presence of nectin-1 is sufficient to promote membrane fusion and HSV-1 entry into epithelial and neuronal cells [14-16]. In addition to its role in the fusion between viral envelope and host cell membrane, HSV-1 gD also acts as a signalling molecule and conditions host cells for viral replication. Thus, HSV-1 gD has been shown to trigger the activation of NF- κ B, which participates in the protection of the myeloid U937 cells against apoptosis [17,18].

In previous studies, we demonstrated that cyclophilin B (CyPB) is an inflammatory factor, which triggers migration and integrin-mediated adhesion of T-lymphocytes and monocytes/macrophages *via* interactions with two types of binding sites, CD147 and cell surface HS [19-21]. Importantly, we found that functional binding of CyPB was dependent on the interaction with 3-O-sulfated HS. Indeed, silencing the expression of 3-OST3B strongly reduced the responses in T-lymphocytes, thus confirming that 3-O-sulfation is a key modification that provides specialized HS structures for CyPB binding [22]. We also demonstrated that the minimal heparin motif for CyPB binding is an octasaccharide, which contains a 3-O-sulfated GlcNH₂ [23,24]. Interestingly, such structural features had been described in the heparin binding motif for HSV-1 gD [25,26]. Moreover, HS 3-O-sulfation by 3-OST3B was also reported to provide binding sites for HSV-1 [5], thus suggesting that HS motifs with binding properties for HSV-1 gD and CyPB could be the same.

A soluble form of HSV-1 gD was reported to protect myeloid cells against apoptosis [17,18]. In a recent work, we demonstrated that CyPB was capable of attenuating pro-inflammatory response in primary macrophages [27]. These findings prompted us to investigate whether both 3-O-sulfated ligands could share the same anti-apoptotic activity towards macrophages. First, we checked that soluble HSV-1 gD was efficient to trigger cellular responses in human primary macrophages. We then analysed whether HSV-1 gD and CyPB were capable of protecting macrophages against staurosporin-induced apoptosis. After demonstrating that these cells mainly express HVEM, nectin-2, and 3-OST2 as 3-O-sulfated HS generating enzyme, we analysed their participation in the anti-apoptotic activity of HSV-1 gD and CyPB by RNA interference. We found that both 3-O-sulfated HS ligands induced the same responses in macrophages, by a common mechanism involving 3-OST2 and HVEM. Collectively, our results suggest that HSV-1 might hijack the binding sites for CyPB in order to protect host cells against apoptosis for efficient infection.

Results

Functional interactions of HSV-1 gD with human primary macrophages

In their previous works, Sciortino *et al.* had reported that a soluble form of HSV-1 gD was capable of activating NF- κ B pathway in U937 myeloid cells [18]. In the current study, we intended to confirm these findings with human primary macrophages and to investigate whether HSV-1 gD was also efficient to activate ERK1/2 and Akt kinases. Exposure of macrophages to 1 μ g/mL of a recombinant form of HSV-1 gD (25 nM) led to a rapid degradation of I- κ B. Concomitantly, we observed an increase in the phosphorylation of NF- κ B p65 subunit, which confirmed that NF- κ B was efficiently activated following its dissociation from its sequestering inhibitor. In addition, we found that ERK1/2 and Akt were rapidly phosphorylated following exposure to HSV-1 gD. Time-course analysis revealed that the activation of the kinases was maximal at 30 min post-stimulation and extended over 2 h of stimulation (Figure 1).

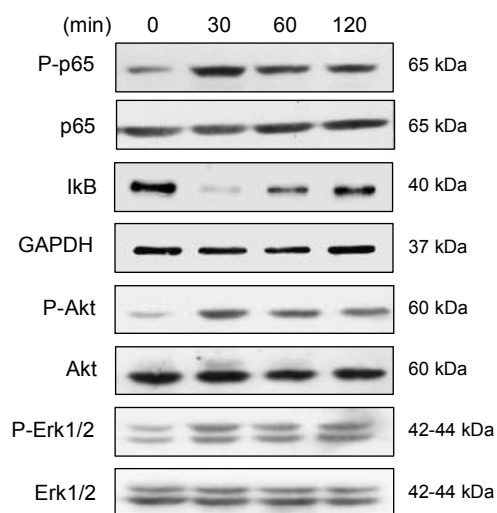


Figure 1. HSV-1 gD-induced signalling in human primary macrophages. Monocyte-derived macrophages were stimulated with HSV-1 gD (1 μ g/mL) for the indicated times. Following cell lysis, proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting with antibodies to I- κ B, phospho-NF- κ B p65 (P-p65), phospho-ERK1/2 (P-ERK1/2) and phospho-Akt (P-Akt). Parallel immunoblotting with antibodies to NF- κ B p65 subunit, GAPDH, ERK1/2 and Akt confirmed equal loading of samples. Data are representative of three separate experiments conducted with cells from distinct donors.

HSV-1 gD is capable of interacting with various cell types, *via* its surface binding to 3-O-sulfated HS and/or to one among the three receptors nectin-1, nectin-2 and HVEM. In an attempt to identify the mechanisms by which HSV-1 gD initiated signalling events in macrophages, we decided to analyse the expression of these binding sites by real-time RT-PCR. First, we confirmed that 3-OST2 was the main 3-O-sulfated HS-generating enzyme expressed in macrophages [28]. In contrast, 3-OST1, 3A and 3B were weakly expressed,

and 3-OST4, 5 and 6 were not detected (Figure 2A). We also found that macrophages expressed a very high level of mRNA encoding HVEM. By comparison, nectin-2 was poorly expressed and the level of nectin-1 mRNA was barely detectable (Figure 2B). The expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 in macrophages was confirmed by Western blot (Figure 2C). As expected, we found a high expression of HVEM, while nectin-2 was less represented. In addition, 3-OST2 was strongly expressed in macrophages, suggesting that it could efficiently participate to the synthesis of 3-O-sulfated HS with binding properties for HSV-1 gD [8].

In previous works, we demonstrated that CyPB was also a ligand of 3-O-sulfated HS, for which the synthesis was dependent on the activity of type gD 3-OSTs [24]. Thus, we hypothesized that CyPB could compete with the binding of HSV-1 gD to macrophages. To this end, we used a recombinant His-tagged HSV-1 gD protein, for which the binding was detected with an Alexa-488 anti-His-tag antibody [29]. In our hands, a non-specific scattered staining of macrophages was observed with primary antibody alone (Figure 2D, panel a). In contrast, incubation with 250 nM HSV-1 gD (10 µg/mL) prior to the addition of Alexa-488 antibody led to an additional fluorescent staining located at the cell membrane of macrophages (Figure 2D, panel b). A significant staining was already observed in the presence of 25 nM of HSV-1 gD (data not shown). However, the intensity of the fluorescence signal was stronger at 250 nM, which suggests that the highest concentration was required to maintain a full saturation of cell surface binding sites. Surface staining with HSV-1 gD was partially reduced in the presence of a 10-fold molar excess of CyPB (Figure 2D, panel c) and completely abolished with a 100-fold molar excess of CyPB (Figure 2D, panel d). These observations thus support the idea that both proteins probably shared common binding sites at the surface of macrophages. Interestingly, we previously reported that CyPB was capable of activating ERK1/2, Akt and NF-κB in macrophages to a similar extent than HSV-1 gD [27]. Thus, these observations suggest that both proteins could also trigger similar responses in macrophages.

HSV-1 gD and CyPB-mediated protection of macrophages against apoptosis

In their previous works, Medici *et al.* reported that HSV-1 was capable of protecting U937 cells against apoptosis [17]. They also demonstrated that cell treatment with recombinant HSV-1 gD was efficient enough to reproduce the anti-apoptotic property of the virus. Hence, we investigated whether HSV-1 gD was capable of inducing a similar response in primary macrophages. To this end, monocyte-derived macrophages were incubated with HSV-1 gD (25 nM) for 8 h, after which apoptosis was induced by the addition of 0.5 µM staurosporin. We decided to use this pro-apoptotic drug because of its efficiency to induce a full activation of caspase-3 in primary macrophages [18,30,31]. The experimental conditions

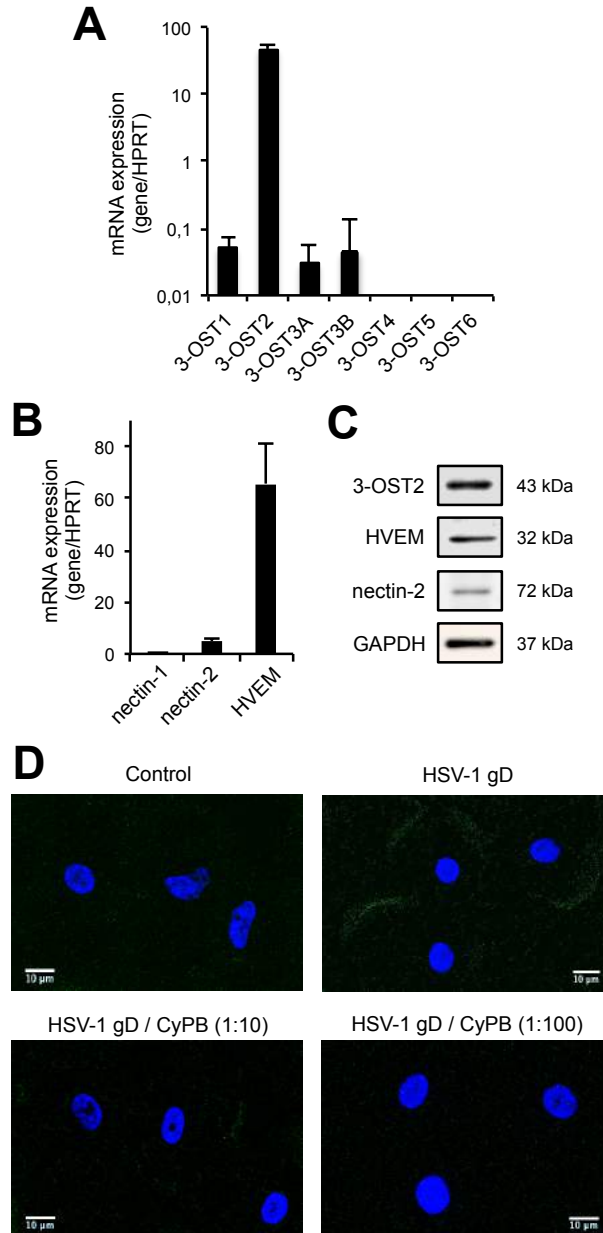


Figure 2. Identification of the HSV-1 gD binding sites in primary macrophages. Analysis of the expression of mRNA encoding 3-O-sulfated HS-generating enzymes (A) and HSV-gD receptors (B). Following reverse transcription of RNA extracted from primary macrophages, the level of mRNA for 3-OSTs, HVEM, nectin-1 and nectin-2 was quantified by real-time RT-PCR. Relative transcript abundance was normalized to HPRT mRNA. Data are means \pm S.D. and were obtained with macrophages from six different donors. (C) Immunostaining of endogenous HVEM, nectin-2 and 3-OST2 in macrophages. Macrophages from the same donor were lysed and the expression of proteins of interest was analysed by Western-Blot. Detection of GAPDH confirmed equal loading of samples. Representative results from three separate experiments are shown. (D) Competitive experiments for HSV-1 gD binding to macrophages. Cells were incubated with 10 μ g/mL (250 nM) of His-tagged gD in the absence (panel b) or presence of CyPB at 2.5 μ M (panel c) or 25 μ M (panel d). After 1 h of incubation at 4°C, HSV-1 gD binding was detected with an anti-His-tag antibody conjugated to Alexa 488 for analysis by confocal microscopy (green fluorescence). Control (panel a) was determined in the absence of any ligand. DAPI staining allowed visualization of cell nuclei (blue fluorescence). Scale bar = 10 μ m. Images were representative of five experiments conducted with cells from distinct donors.

for induction of apoptosis by staurosporin were retained to reduce necrosing effects of the pro-apoptotic drug in primary macrophages. In first experiments, cell apoptosis was evaluated by analysing phosphatidylserine externalization, a mechanism that reflects the earlier stages of apoptosis. Following treatment with staurosporin, macrophages were stained with fluorescent annexin-V and propidium iodide (PI) and analysed by flow cytometry (Figure 3A-B). In the absence of any treatment, the percentage of apoptosis (including early and late apoptotic cells) was less than 8 %. As expected, cell treatment with staurosporin resulted in a strong increase in apoptosis, with a number of early apoptotic cells corresponding to 42 ± 6 % of the whole cell population. Moreover, the percentages of late apoptotic and necrotic cells were less than 5 % and 0.5 % respectively, confirming that our experimental conditions were appropriate to measure early events of apoptosis. Exposure of macrophages to HSV-1 gD prior to the treatment with staurosporin reduced the percentage of early apoptotic cells to 10.5 ± 2 %, thus confirming the protective property of the viral protein [17]. We then reproduced the same experiment with CyPB. To a similar extent, macrophages were exposed to CyPB (50 nM) for 8 h, after which apoptosis was induced by the addition of staurosporin for 4 h. Under these conditions, the percentage of early apoptotic cells was at 12.4 ± 3 %, which was close to the value obtained with HSV-1 gD. In order to validate these first results, we next examined the inhibitory property of both proteins on the activation of caspase-3, because of the key role of this protease in the induction of apoptosis. As shown in Figure 3C, we found that cell treatment with staurosporin strongly increased the activity of caspase-3 ($\times 14.5$ when compared with untreated cells). Exposure of macrophages to either HSV-1 gD or CyPB prior to the addition of staurosporin was effective to reduce the activation of caspase-3 to a similar extent. Indeed, the activity of caspase-3 was decreased by 75 % in cells exposed to both proteins, when compared to the response measured in cells treated with staurosporin alone. Collectively, these data indicate that HSV-1 gD and CyPB shared similar protective properties against apoptosis induced by staurosporin in primary macrophages.

Effect of HSV-1 gD and CyPB on the induction of anti-apoptotic genes in macrophages

Previous works reported that the expression of *Bcl-2* and *Bcl-2L1* genes was up-regulated in human fibroblasts exposed to HSV-1. Interestingly, this response was no more observed with Δ HSV-1 gD virions, thus illustrating a critical role of HSV-1 gD in the mechanisms leading to *Bcl-2* and *Bcl-2L1* overexpression [32]. Depending on cell environment, two proteins with antagonist functions can be produced from *Bcl-2L1* gene by mRNA splicing: the longer form, termed Bcl-XL, exhibits anti-apoptotic activity, while the shorter form, termed Bcl-XS, is a promoter of apoptosis [33]. Hence, we analysed the ability

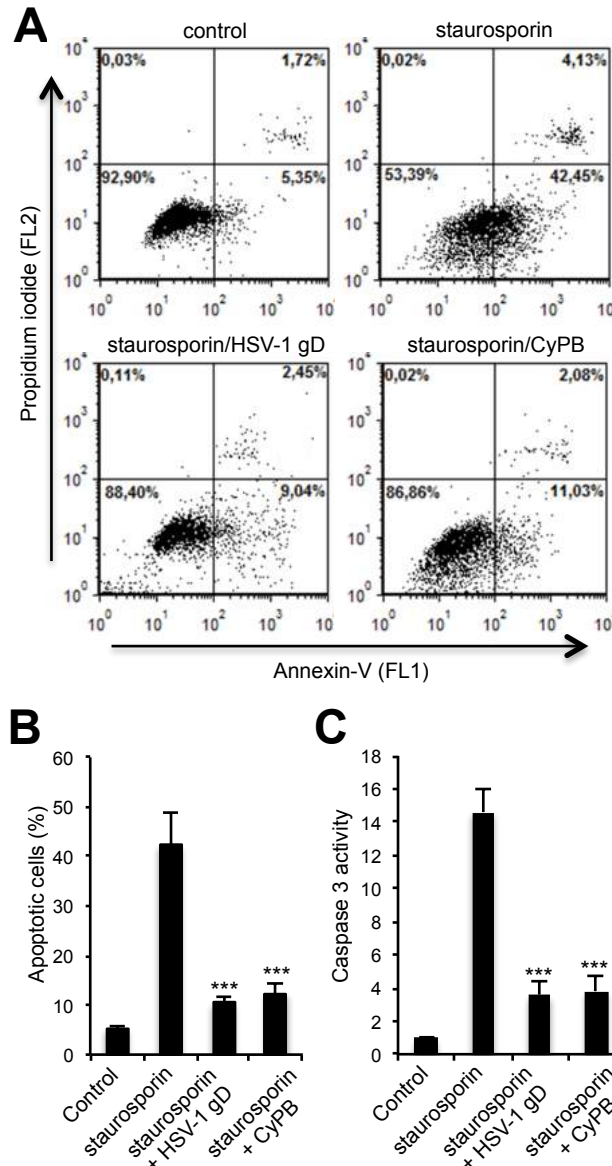


Figure 3. Protective effects of HSV-1 gD and CyPB against apoptosis in primary macrophages. (A-B) Flow cytometry analysis of staurosporin-induced apoptosis. Macrophages were either untreated or treated with HSV-1 gD or CyPB (both at 1 μ g/mL) for 8 h and subsequently exposed to staurosporin (0.5 μ M) for 4 h. At the end of incubation, cells were stained with fluorescein-conjugated annexin-V (FL1) and PI (FL2) for flow cytometry analysis. (A) Representative dot-blots showing the distribution of viable (annexin-V⁻/PI⁻), early apoptotic (annexin-V⁺/PI⁻), late apoptotic (annexin-V⁺/PI⁺) and necrotic (annexin-V⁻/PI⁺) cell populations. (B) Percentages of early apoptotic cells (annexin-V⁺/PI⁻). Values are means \pm S.D. from five experiments conducted with macrophages from distinct donors. (C) Analysis of caspase-3 activation. Following incubation in the absence or presence of HSV-1 gD or CyPB, macrophages were exposed to staurosporin for 4 h, after which they were lysed. Caspase-3 activity was then measured in cell lysates by using the fluorescent Ac-DEVD-AMC substrate, as described in “Materials and Methods”. Data are expressed as fold increase in caspase-3 activity by comparison with cells cultured in the absence of staurosporin. Results are means \pm S.D. of five independent experiments performed with cells isolated from distinct donors (*** $P < 0.001$, significantly different when compared to cells exposed to staurosporin alone).

of HSV-1 gD and CyPB to modulate the expression of mRNA encoding Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-XS in macrophages by using real-time RT-PCR (Figure 4). Time-course experiments revealed that the levels of Bcl-2 and Bcl-XL mRNAs were similarly increased in response to either HSV-1 gD or CyPB, with an expression peaking at 8 h post-stimulation. Concomitantly, the level of mRNA encoding Bcl-XS decreased in cells exposed to HSV-1 gD or CyPB. The inhibitory effect (~50 %) was maximal at 8 h post-stimulation and was maintained over 24 h. Taken together, these results indicate that HSV-1 gD and CyPB are capable of regulating the balance between pro- and anti-apoptotic factors, which is consistent with the protective properties of these proteins against apoptosis.

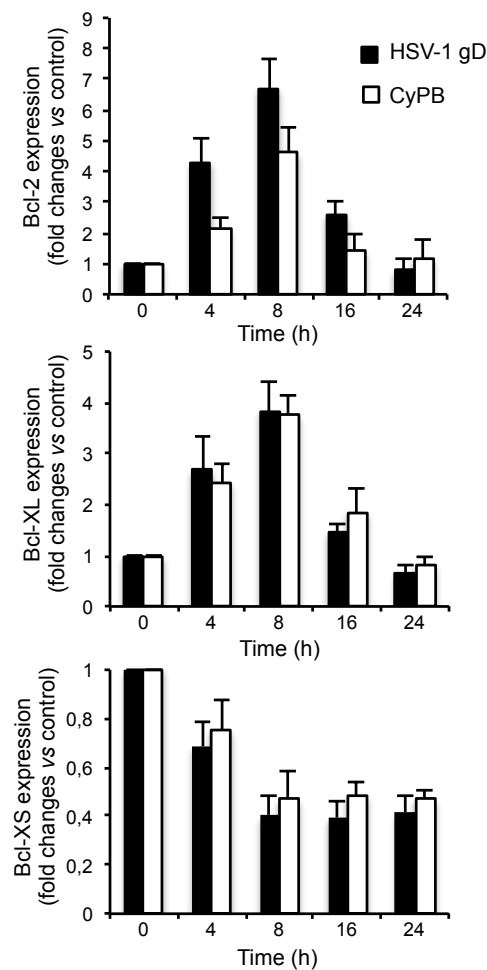


Figure 4. Modulation of the expression of apoptotic genes in primary macrophages. Macrophages were incubated in presence of HSV-1 gD or CyPB, both at 1 μ g/mL. At the indicated times, cells were harvested and the expression of mRNA encoding Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-XS was analysed by real-time RT-PCR. Relative transcript abundance was normalized to endogenous HPRT mRNA. Results are expressed as fold changes by comparison with non-stimulated cells. Values correspond to means \pm S.D. of five independent experiments conducted with macrophages from distinct donors ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, significantly different when compared to unstimulated cells).

Silencing of the expression of 3-OST2 and HSV-1 gD receptors by RNA interference

In order to decipher the underlying mechanisms responsible for the responses induced by HSV-1 gD and CyPB in macrophages, we used an approach based on RNA interference. We focused our interest on 3-OST2, HVEM and nectin-2, because of their higher expression when compared to other 3-OST isoenzymes and nectin-1. Treatment of macrophages with specific siRNA targeting 3-OST2, HVEM and nectin-2 (termed si-3-OST2, si-HVEM and si-nectin-2, respectively) resulted in a significant down-regulation of corresponding mRNA (Figures 5A). After 48 h of transfection, the inhibitory effects were at 75 %, 72 % and 74 % respectively, when compared to the results obtained with control siRNA. Importantly, we checked that the levels of mRNA encoding 3-OST1, 3-OST3A and 3-OST3B were not modified in the presence of si-3-OST2. Similarly, si-HVEM and si-nectin-2 significantly reduced the expression of their target mRNA, without any cross-reaction. The efficiency of each siRNA was then confirmed by analysing the production of 3-OST2, HVEM and nectin-2 in cell lysates by Western blot (Figure 5B). As expected, we found that the levels of expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 were considerably reduced in macrophages treated with specific siRNA for 48 h. In addition, no significant change in the expression of HVEM was observed in macrophages treated with siRNA targeting nectin-2 and *vice versa*, thus validating the use of these siRNA for our next experiments.

Identification of functional binding sites for HSV-1 gD and CyPB

In order to know whether the signalling events induced by HSV-1 gD and CyPB are dependent on the interactions with HVEM, nectin-2 and/or 3-O-sulfated HS, we decided to analyse the activation of ERK1/2 and Akt in siRNA-treated macrophages (Figure 6). As expected, cell treatment with the negative control siRNA did not hamper the responses induced by either HSV-1 gD or CyPB. Both stimuli were still efficient to induce the phosphorylation of ERK1/2 and Akt in macrophages, with a maximal activation observed at 30 min of stimulation. The same experiments were then reproduced with specific siRNAs. When compared to control cells, we found that silencing the expression of nectin-2 did not significantly alter the activation of ERK1/2 and Akt, thus indicating that this receptor was not involved in the responses induced by HSV-1 gD and CyPB. In contrast, down-regulation of 3-OST2 strongly reduced the ability of both proteins to activate Akt and ERK1/2. These results were however expected, because of the requirement of 3-O-sulfated HS in the binding of HSV-1 gD and CyPB to responsive cells. When analysing the phosphorylation status of ERK1/2 and Akt in macrophages treated with si-HVEM, we found a similar inhibitory effect on the responses induced by both stimuli. Although the results obtained with HSV-1 gD were in agreement with the literature data, they were unexpected for CyPB. Indeed, HVEM has been well-described as a functional receptor for HSV-1 gD [18,34]. In contrast, we are the first to

demonstrate a functional interaction between HVEM and CyPB, which suggests that both proteins shared the same signalling receptor in macrophages. Collectively, these observations suggest that HSV-1 gD and CyPB probably interact with a signalling complex formed by the association of 3-O-sulfated HS and HVEM at the surface of macrophages.

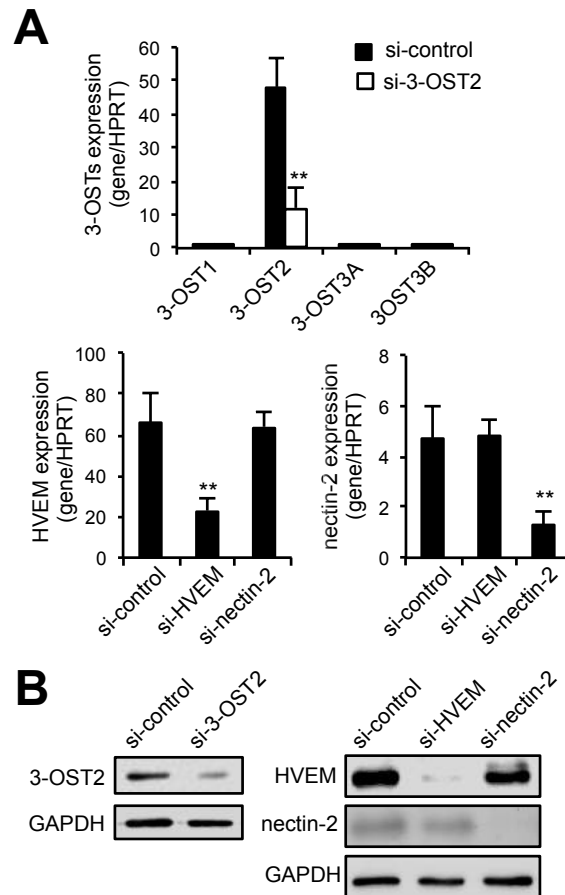


Figure 5. Down-regulation of the expression of nectin-2, HVEM or 3-OST2 by RNA interference. Synthetic siRNA (termed si-3-OST2, si-HVEM and si-nectin-2) were used to specifically inhibit the expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 in human macrophages. Following transfection of macrophages with si-3-OST2, si-HVEM and si-nectin-2, the expression of mRNAs encoding 3-OSTs, HVEM and nectin-2 was quantified by real-time RT-PCR (A). A negative control siRNA (si-control) was used to check for the specificity of silencing. Relative transcript abundance was normalized to HPRT mRNA. Data are means \pm S.D. of five independent experiments conducted with macrophages from distinct donors ($***P < 0.001$, significantly different when compared to cells transfected with si-control). (B) The efficacy of siRNA to down-regulate the expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 was checked by Western blot. Parallel immunoblotting with anti-GAPDH confirmed equal loading of the samples. Representative results from three separate experiments are shown.

Role of HVEM and 3-O-sulfated HS in the anti-apoptotic activity of HSV-1 gD and CyPB

To gain evidence into the relationships between the responses induced by HSV-1 gD and CyPB in macrophages and the interactions of both proteins with 3-O-sulfated HS and HVEM, we analysed the anti-apoptotic properties of both proteins in siRNA-treated cells.

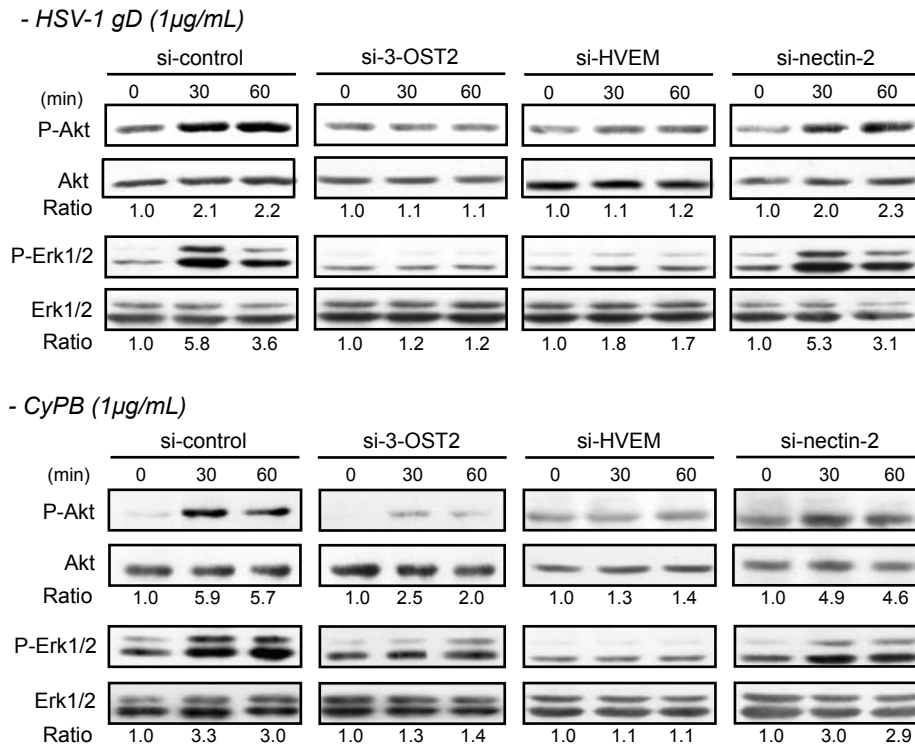


Figure 6. Effect of silencing the expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 on HSV-1 gD- and CyPB-induced signalling in macrophages. The contribution of 3-OST2 (as a 3-O-sulfated HS generating enzyme) and of HVEM and nectin-2 to the activation of signalling pathways was evaluated by analysing the phosphorylation of Akt and ERK1/2 in siRNA-transfected macrophages. Following treatment with siRNA for 48 h, cells were stimulated with HSV-1 gD or CyPB (both at 1 µg/mL) for various times, and the phosphorylation of ERK1/2 (P-ERK1/2) and Akt (P-Akt) was analysed by Western blot. Parallel immunoblotting with antibodies to Akt and ERK1/2 confirmed equal loading of samples. Data are representative of three independent experiments. The ratio of P-Akt / Akt and P-ERK1/2 / ERK1/2 were quantified and normalized to unstimulated cells.

As expected, treatment of macrophages with negative control siRNA did not alter the protective effect of HSV-1 gD and CyPB against apoptosis, as demonstrated by their efficiency to reduce annexin-V binding (Figure 7A) and caspase-3 activation (Figure 7B) in response to staurosporin. Similarly, silencing the expression of nectin-2 had no notable effect on the capability of HSV-1 gD and CyPB to inhibit staurosporin-induced apoptosis, which confirmed that the responses induced by both proteins were not dependent on the expression of this receptor. In contrast, down-regulation of HVEM and 3-OST2 rendered the cells unresponsive to both stimuli, thus restoring the capacity of staurosporin to induce apoptosis. Indeed, the rates of annexin-V binding and caspase-3 activation were not significantly modified by the addition of HSV-1 gD and CyPB, when compared to the same siRNA-treated cells exposed to staurosporin alone. Finally, we analysed the expression of Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS in siRNA-treated macrophages exposed to HSV-1 gD and CyPB (Figure 7C). First, we found that cell treatment with negative control siRNA or si-nectin-2 did

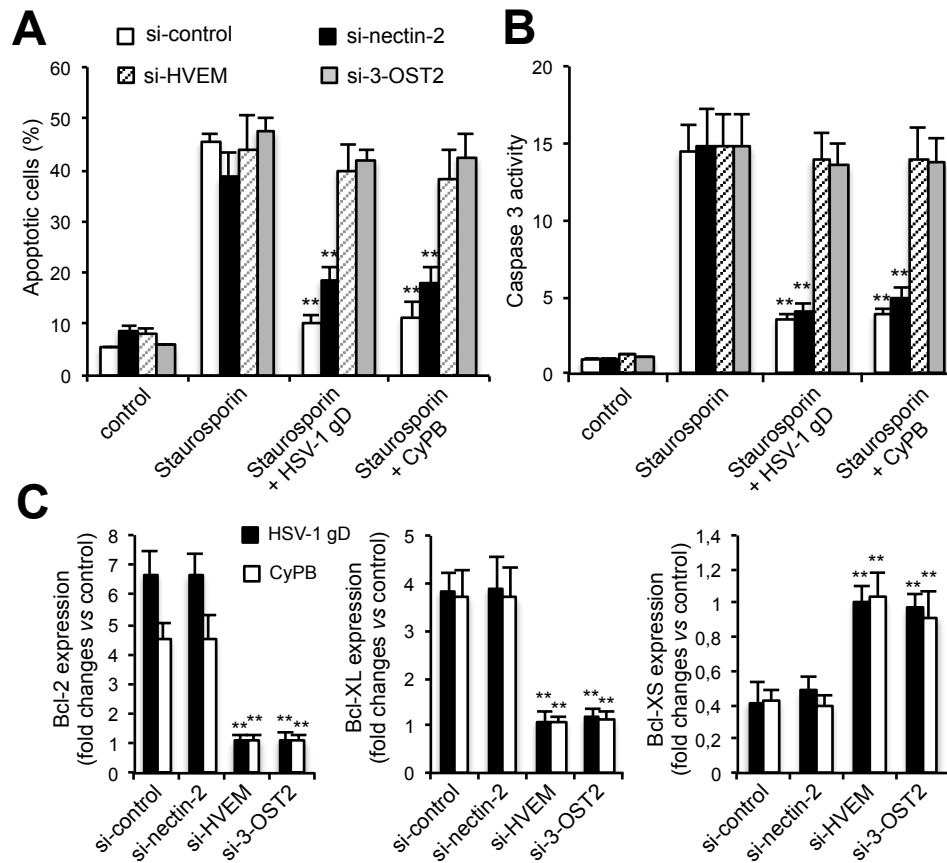


Figure 7. Effects of silencing the expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 on the anti-apoptotic properties of HSV-1 gD and CyPB. The contribution of 3-OST2 (as a 3-O-sulfated HS generating enzyme) and of HVEM and nectin-2 to the protective effect of HSV-1 gD and CyPB was analysed by measuring staurosporin-induced apoptosis in siRNA-treated macrophages. Following treatment with siRNA for 48 h, cells were incubated or not with HSV-1 gD and CyPB (1 μ g/mL) for 8 h, after which they were exposed to staurosporin (0.5 μ M) for 4 h. (A) The percentage of apoptotic cell population was evaluated by analysing the binding of fluorescein-conjugated annexin-V. Each bar of histogram represents mean \pm S.D. of the rate of apoptotic cells (annexin-V⁺/PI⁺) obtained from five distinct experiments. (B) In parallel experiments, the activation of caspase-3 was analysed in siRNA-treated cells after exposure to staurosporin. Results are expressed as fold increase in caspase-3 activity by comparison with untreated cells and correspond to means \pm S.D. from five independent experiments (** P < 0.01, significantly different when compared with the results obtained with staurosporin alone). (C) Variations in the expression of Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-XS was analysed in siRNA-treated macrophages following incubation with HSV-1 gD or CyPB (1 μ g/mL) for 8 h. After extraction of total RNA and reverse transcription, the expression of mRNA encoding Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-XS was analysed by real-time RT-PCR. Relative transcript abundance was normalized to HPRT mRNA. Results are expressed as fold changes by comparison with non-stimulated cells and correspond to means \pm S.D. of three separate experiments (** P < 0.01, significantly different when compared to the results obtained with negative control siRNA).

not significantly modify the expression of the genes encoding Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS in response to both proteins. As previously shown in Figure 4, HSV-1 gD and CyPB were efficient to increase the mRNA levels of Bcl-2 and Bcl-XL, which was associated to a

decrease in the expression of Bcl-XS. In contrast, cell treatment with si-HVEM or si-3-OST2 maintained the mRNA levels of Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS to basal level, confirming that silencing the expression of HVEM and 3-OST2 rendered macrophages unresponsive to the protective effect of HSV-1 gD and CyPB.

In previous works, CyPB was reported to induce migration and integrin-mediated adhesion of T-lymphocytes and monocytes/macrophages, by a mechanism dependent on CD147 [19-21,35-37]. Thus, we analysed the anti-apoptotic responses triggered by CyPB and HSV-1 gD in macrophages that were pre-treated with siRNA targeting CD147. In our experiments, CD147 expression was reduced by less than 80 %, because stronger inhibition altered the viability of macrophages. We found that the protective effect of CyPB was not modified in si-CD147-treated cells. However, a plausible explanation might be that down-regulation of CD147 expression was not sufficient to visualize an effect on the response of CyPB. Nevertheless, we found that HSV-1 gD was as efficient as CyPB to prevent staurosporin-induced apoptosis and to induce the expression of anti-apoptotic proteins in si-CD147-treated cells (data not shown). Thus, both proteins retained their anti-apoptotic activity in si-CD147-treated cells, which suggests that CD147 is not involved in the anti-apoptotic activity of CyPB.

Taken together, these results support the idea that HSV-1 gD and CyPB shared the same protective activity in macrophages by interacting with a complex formed by the association of HVEM and 3-O-sulfated HS.

Discussion

Due to their high structural heterogeneity, HS are capable of interacting with numerous extracellular mediators, such as growth factors, morphogens, cytokines, chemokines, adhesion molecules or viral glycoproteins, for which they control bio availability and functions. Consequently, HS are involved in many physiological and pathological processes, including cellular proliferation, differentiation, adhesion, migration and viral infection [1-4]. The structural distinction in HS sequences is derived from enzymatic modifications during the maturation phase of the glycanic backbone in the Golgi apparatus. Although the reaction of 3-O-sulfation is catalysed by the largest family of HS sulfotransferases, it is the least abundant modification and to date, very few proteins have been described as ligands for 3-O-sulfated HS [10]. Among them, HSV-1 gD and CyPB have been the subject of numerous studies showing that their respective activities were dependent on the interactions with HS motifs containing a 3-O-sulfated GlcN residue [5-9,24]. In addition to controlling the critical step of membrane fusion between the virus and its target cells, HSV-1 gD was also reported as the main signalling molecule within HSV-1 envelope to condition

host cells for viral replication. A soluble form of HSV-1 gD was as efficient as the viral particle to protect myeloid cells against apoptosis. Moreover, HSV-1 gD was capable of modulating the expression of apoptosis-related genes in primary fibroblasts, thus leading to an increase in cell survival [17,18,32]. On the other hand, we demonstrated that CyPB was effective in reducing pro-inflammatory response in human primary macrophages [27]. In this context, we decided to test the hypothesis that HSV-1 gD and CyPB could trigger common responses in monocyte-derived macrophages.

First, we confirmed that exposure of primary macrophages to a soluble form of HSV-1 gD led to the activation of NF- κ B, Akt and ERK1/2 signalling molecules and to the protection against staurosporin-induced apoptosis. Previous studies reporting a protective effect of HSV-1 gD had been undertaken in U937 cells with anti-Fas antibody and staurosporin as apoptosis inducers [17,18]. However, primary macrophages are known to be resistant to Fas-induced apoptosis [31]. Thus, we decided to use staurosporin to obtain a full activation of pro-apoptotic pathways in monocyte-derived macrophages [30]. In our experimental model, the protective effects of HSV-1 gD were accompanied by up-regulation of genes encoding the anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-XL and concomitant decrease in the expression of pro-apoptotic Bcl-XS, which is consistent with previous results obtained in myeloid cells and fibroblasts. In parallel experiments, we found that CyPB triggered the same anti-apoptotic responses in macrophages. In our previous works, we had demonstrated that CyPB also triggered the activation of NF- κ B, Akt and ERK1/2 in macrophages [27]. Hence, the current results extend our previous studies and demonstrate that, besides pro-migratory and anti-inflammatory activities [19,27], CyPB may induce similar protective effects as HSV-1 gD against apoptosis in human macrophages.

Following its attachment to the surface of target cells, HSV-1 entry is dependent on the fusion between the viral envelope and host cell membrane, a mechanism requiring the participation of HSV-1 gD. In addition to 3-O-sulfated HS, other cell surface binding sites for HSV-1 gD have been described, *i.e.* HVEM, nectin-1, nectin-2. The relative contribution of these diverse HSV-1 gD binding sites allows the virus to infect multiple target cells. As example, HSV-1 entry in fibroblasts and hematopoietic cells is critically dependent on 3-O-sulfated HS, even though HVEM and nectin-2 are also present at the cell surface [5,12,13]. In contrast, nectin-1 is sufficient for HSV-1 entry within epithelial and neuronal cells [14-16]. We then analysed the expression of HSV-1 receptors and 3-O-sulfated HS generating enzymes in primary macrophages. We found that HVEM was the major receptor present in these cells, while nectin-2 was also detected but to a lower level of expression. In accordance with our previous results, we also confirmed that 3-OST2 is the main 3-OST isoenzyme expressed in macrophages [28]. In order to identify the way by which HSV-1 gD induced protective responses in macrophages, we used an approach based on RNA

interference. We found that silencing the expression of 3-OST2 strongly reduced the ability of HSV-1 gD and CyPB to induce the activation of Akt and ERK1/2 and to modulate the expression of Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-XS. Moreover, the protective effect of both proteins against staurosporin-induced apoptosis was considerably altered. Thus, these results confirmed that the responses induced by HSV-1 gD and CyPB are dependent on the interactions with 3-O-sulfated HS. Given that 3-OST2 is highly expressed in primary macrophages, it is likely to contribute to the generation of the majority of 3-O-sulfated HS species. Notably, we demonstrated that surface binding of HSV-1 gD to macrophages was efficiently inhibited by an excess of CyPB. Thus, these results further support the idea that 3-O-sulfated HS motifs with binding properties for HSV-1 gD and CyPB are probably the same. In parallel experiments, we found that silencing the expression of HVEM strongly reduced the responses induced by HSV-1 gD and CyPB in macrophages, while down-regulation of nectin-2 had no notable inhibitory effect. These results indicate that HVEM participates in the activation of signalling pathways induced by HSV-1 gD and contributes to its protective effect against apoptosis. However, it is important to note that HVEM and 3-O-sulfated HS have not redundant activities. Indeed, silencing the expression of 3-OST-2 was as efficient to obtain a full inhibition of the responses induced HSV-1 gD, indicating that the absence of 3-O-sulfated HS was not compensated by the presence of HVEM, and *vice versa*. Thus, these results suggest a model in which HSV-1 gD probably interact with a signalling complex formed by the association of 3-O-sulfated HS and HVEM at the surface of macrophages. Surprisingly, silencing the expression of HVEM also altered the responses induced by CyPB. These findings were unexpected, because HVEM was not described as a receptor for CyPB. On another hand, we and others reported that CyPB triggered the migration and adhesion of immune cells, *via* a mechanism involving CD147 [19,20,35,37]. This glycoprotein is expressed in many cell types and possesses a diverse range of functions, which rely on its ability to interact with a number of binding partners. It is widely expressed in human tumours and plays a central role in the progression of many cancers by regulating cell proliferation, apoptosis and migration [38]. Inhibitory agents targeting either CD147 or CyPB activity reduced the migration of immune cells, which indicates that CD147-CyPB interaction is mainly involved in the inflammatory response [19,36,37]. However, we did not observed any direct interaction with CyPB, suggesting that CD147 is rather a co-signalling molecule involved in the activation of migratory pathways. In particular, we demonstrated that it participates to the association of CD98 with β 1 integrins, which was required to promote monocyte adhesion in response to CyPB [21,39]. In that context, we verified whether CD147 could be also involved in the anti-apoptotic activity of CyPB. In our experiments, silencing the expression of CD147 did not significantly modify the protective effect of CyPB, which remained as efficient as HSV-1 gD to prevent staurosporin-induced apoptosis and to induce

the expression of anti-apoptotic proteins in macrophages. Thus, these results suggested that CD147 did not participate in the common anti-apoptotic activity of CyPB and HSV-1gD. Altogether, our findings demonstrate for the first time that HSV-1 gD and CyPB share the same anti-apoptotic activity by interacting with the same binding sites, *i.e.* HVEM and 3-O-sulfated HS, at the surface of macrophages.

In their recent work, Oh *et al.* reported that overexpressed CyPB decreased MPP⁺-induced oxidative stress and inhibited the activation of pro-apoptotic molecules in SH-SY5Y neuroblastoma cells [40]. In a previous study, the same authors had showed that CyPB also protected PC12 cells from beta-amyloid-induced neurotoxicity in an *in vitro* Alzheimer disease model [41]. Collectively, these results suggested that CyPB could protect neuronal cells from apoptosis in some pathological disorders. In that context, the current work further supports the assumption that CyPB exhibits a protective activity, at least in cells of neuronal and myeloid lineages, and revealed that HSV-1 gD possibly shares the same anti-apoptotic properties by hijacking the receptors of CyPB. In addition to this protective activity, HSV-1 gD and CyPB were reported to trigger other common properties. Indeed, both of them exhibit anti-inflammatory activities. We showed that CyPB was capable to attenuate the responses of pro-inflammatory macrophages, *via* a mechanism dependent on the expression of Bcl-3 (*B-Cell Lymphoma-3*) [27]. On the other hand, HSV-1 gD was described to mimic the interaction between HVEM and BTLA (*B- and T-lymphocyte attenuator*), the latter being a natural ligand of the receptor. Such an interaction induces a tolerogenic environment, which leads to alterations in the immune response [42]. Further investigations are needed to know whether the anti-inflammatory properties of HSV-1 gD and CyPB are also dependent on the interaction with HVEM and 3-O-sulfated HS, and to prove that the protective effect of CyPB is relevant *in vivo*.

HSV-1 has been incriminated in the occurrence of corneal lesions and neurological damages in immuno-compromised individuals and neonates. Recurrent herpetic stromal keratitis may lead to severe vision impairments, making this infection as the main cause of induced blindness in developed countries. It is characterized by fibroblast proliferation and chronic inflammation, which is maintained by the recruitment and survival of activated macrophages at the site of the lesion [12,43]. The implication of 3-O-sulfated HS in the mechanisms controlling HSV-1 entry has been extensively studied and described to be specific of HSV-1 gD [5, 12, 44]. Here, we demonstrated that the interaction between HSV-1 gD and 3-O-sulfated HS was also of critical importance for inducing survival signals in macrophages. Thus, our results provide new information on the mechanism by which HSV-1 gD may participate to the persistence of inflamed macrophages in herpetic corneal lesions. Entry of HSV serotypes into cells depends on the interactions between multiple viral glycoproteins and host receptors. HSV-1 shares common receptors and pathways that are

also used by HSV-2. Thus, HVEM and nectin-1 are utilized by the gD glycoprotein of both viruses. Cell surface HS are also recognized by other viral glycoproteins, namely gB and gC. However, only HSV-1 gD is capable of specifically interacting with 3-O-sulfated HS. This unique property may explain the preferential tropism of HSV-1 for host cells that express high levels of certain 3-OSTs [11,44,45]. In previous work, we reported that M2 macrophages contained almost twice more HS than M1 macrophages, with a relatively higher sulfation rate. To gain information on these structural modifications upon macrophage polarization, we analysed the expression of HS sulfotransferases and we found that the most dramatic changes were observed in the expression of 3-OST isoenzymes. While 3-OST2 was highly expressed in M2 macrophages, it was replaced by 3-OST3B in M1 macrophages [28]. Both isoforms catalyse the same reaction of 3-O-sulfation *in vitro* and their ectopic expression in CHO cells allowed HSV-1 infection [5,8]. Thus, these results suggest that macrophages are capable of generating HS-binding sites for HSV-1 gD irrespective of their polarization status. However, we also demonstrated that 2-OST was more expressed in M2 than in M1 subtypes. Interestingly, type gD 3-OSTs preferentially modify GlcNS or GlcNH₂ residues adjacent to an IdoUA2S residue [10], which indicates that M2 macrophages have the enzymatic machinery to produce more HS-binding sites for HSV-1 gD than M1 macrophages. Therefore, M2 macrophages could be more responsive to the protective effect of HSV-1 gD, which may induce their accumulation in the herpetic lesion and maintain persistent infection.

In this context, drugs targeting the interaction between the viral glycoprotein and 3-O-sulfated HS may be helpful for the development of therapeutic agents for treating corneal inflammation. Potential drugs may mimic HS oligosaccharides, and a growing interest has focused on the use of recombinant sulfotransferases to synthesize HS-derived molecules with therapeutic application [46]. As example, using a 3-O-sulfated heparin octasaccharide was effective to inhibit HSV-1 infection by blocking viral entry [47]. On the other hand, blocking the protein-binding domains of HS chains with synthetic peptides may be also a valuable approach to inhibit the interaction with HSV-1. In this way, Tiwari *et al.* identified anti-HSV-1 agents in two groups of peptides showing either alternating (G1) or clustered (G2) positive charges [48]. Interestingly, G2 peptide isolated against 3-O-sulfated HS was found to display wider ability to inhibit HSV-1 entry. In previous works, we demonstrated that the interaction between HS and CyPB involved the *N*-terminal extension of the protein, which is unique among the members of the cyclophilin family. This positively charged peptide contains two amino acid clusters, *i.e.* ¹⁴YFD¹⁶ and ³KKK⁵, which are spatially arranged so that they act synergistically to form a binding site for an HS octasaccharide [22,49]. On the assumption that both proteins interact with the same 3-O-sulfated HS motif, a synthetic peptide mimicking the *N*-terminal extension of CyPB may be effective to specifically inhibit

the responses triggered by HSV-1 gD in primary macrophages. This possibility is currently under investigation in our laboratory.

Materials and methods

Materials

Recombinant HSV-1 gD protein was purchased from Fitzgerald (Acton, MA, USA). Recombinant human CyPB was produced in *Escherichia coli*. Following purification, the protein was detoxified on Detoxi-gel Endotoxin Removing Gel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) as described in Marcant *et al.* [26]. The efficacy of LPS removal was checked by using a cell-based assay with HEK-BlueTM-hTLR4 cell line (Invivogen, Toulouse, France). Mouse antibodies to ERK1/2 and to nectin-2 and goat antibody to HVEM were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Rabbit antibody to 3-OST2 was from Thermo Scientific. Rabbit antibodies to phosphorylated ERK1/2 and to phosphorylated Akt, mouse antibody to Akt and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

Preparation of human monocyte-derived macrophages

Human citrated venous blood samples were obtained from the local blood transfusion center (Lille, France). Following isolation of peripheral blood mononuclear cells by density centrifugation on Lymphoprep (Eurobio-AbCys, Courtaboeuf, France), monocytes were purified with magnetic beads coupled to CD14, according to the instructions of the manufacturer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Purity of the cell population was assessed by FACS and found >95%. Macrophages were then obtained by incubating freshly isolated monocytes (1×10^6 cells/mL) for 5 days in RPMI 1640 medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated foetal calf serum and 10 ng/ml of M-CSF (Peprotech, Rocky Hill City, NJ, USA). The experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject (EFS, NT/18/2015/092). The study methodologies conformed to the standards set by the Declaration of Helsinki and were approved by the local ethics committee (French research ministry, DC-2008-242).

RNA isolation and real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from 1×10^6 cells using the NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Reverse transcription was performed from 1 μ g of total RNA by using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific). Synthetic primers for 3-OSTs were described in Martinez *et al.* [27]. Synthetic primers for HVEM, nectin-2, Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-XS were

designed by using Primer-Blast (NCBI) according to published sequences: HVEM (NM_003820.3), 5'-GTGTGGTGTTTAGTGGATAC-3' (forward) and 5'-ACAAATAGAAAACAGGAGCC-3' (reverse); nectin-1 (NM_002855.4), 5'-CATCGTCAACTACCACAT-3' (forward) and 5'-CCTCAATGGTTACCTCAG-3' (reverse); nectin-2 (NM_002856.2), 5'-ATGAGAGCTTCGAGGAAC-3' (forward) and 5'-CGGAGATGGACACTTCAG-3' (reverse); Bcl-2 (NM_000633.2), 5'-GGATGCCTTTGTGGAAGTGT-3' (forward) and 5'-AGCCTGCAATTTTGTTCAT-3' (reverse); Bcl-XL (NM_138578.1), 5'-TGAACAGGTAGTGAATGAAC-3' (forward) and 5'-TCTCCTTGTCTACGCTTT-3' (reverse), and Bcl-XS (NM_001191.2), 5'-CAGAGCTTTGAACAGGATAC-3' (forward) and 5'-GGTAGAGTGGATGGTCAG-3' (reverse) (Eurogentec, Seraing, Belgium). Specificity of the primers was checked by semi-quantitative RT-PCR on a 2.5 % (w/v) agarose gel. All of them amplified only one fragment of expected size, for which the sequence was confirmed (GATC Biotech, Constance, Germany). Real-time PCR amplifications were performed using an Mx3000P Multiplex Quantitative PCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The transcript of HPRT was used as a control to normalize the expression of the genes of interest. Each reaction of PCR consisted of 25 μ L containing 2 μ L of diluted cDNA sample (1:4), 12.5 μ L of Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 1 μ L of forward primer (15 μ M), 1 μ L of reverse primer (15 μ M) 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°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at specific temperature of annealing (60°C for all primer pairs) and 30 s at 72°C. The fluorescence data were measured at the end of each cycle. A melting curve (55-95°C at 1°C interval) was constructed for each primer pair to check for the presence of one gene-specific peak. The amplification efficiency of each primer pair was performed on serial dilutions of cDNA. Triplicate PCR reactions were prepared for each sample. The point at which the PCR product was 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 [50].

Measurement of apoptosis

Following treatment of macrophages with recombinant HSV-1 gD or CyPB (both at 1 μ g/mL) for 8 h, apoptosis was induced by the addition of 0.5 μ M staurosporin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) for 4 h. For apoptosis analysis, macrophages (2×10^5 cells per point) were stained with annexin-V and propidium iodide (PI), using the Annexin-V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were harvested, rapidly washed with phosphate buffer (PBS: 20 mM Na

phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.2) and incubated in staining buffer in the presence of fluorescent annexin-V and PI for 15 min at room temperature. Cell staining was visualized by flow cytometry using a FACSCalibur instrument and analysed with CellQuest software (BD Biosciences), which allowed assignment of cells in viable (annexin-V⁻/PI⁻), early apoptotic (annexin-V⁺/PI⁻), late apoptotic (annexin-V⁺/PI⁺) and necrotic (annexin-V⁻/PI⁺) populations. Activation of caspase-3 was also evaluated by using the caspase-3 assay fluorimetric kit (Sigma-Aldrich), according to manufacturer's instructions. For each experimental condition, 2.5×10^5 cells were lysed overnight at -80°C and the enzymatic activity of caspase-3 was measured thereafter by incubation of cell lysates with Ac-DEVD-AMC substrate. Specificity of the reaction was checked by the addition of Ac-DEVD-CHO caspase-3 inhibitor. After 60 min of incubation at 37°C, release of AMC product was monitored at 405 nm by using a fluorimeter microplate reader. Values of absorbance were converted in caspase-3 activity by using an AMC standard curve and expressed in nanomoles of AMC released per min and per mL of cell lysate.

Western Immunoblotting

Human macrophages (1×10^6 /point) were lysed in 75 μ L lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 8.0), supplemented with 1 mM Na orthovanadate, 10 mM sodium fluoride and protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics, Meylan, France) for 3 h at 4°C. The lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4°C, mixed with Laemmli buffer and boiled for 10 min. Proteins were separated by SDS-PAGE (10 %, w/v) and transferred onto nitrocellulose membrane (Amersham, Uppsala, Sweden). The membrane was blocked for 1 h at room temperature in 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl (TBS) supplemented with 0.05 % (v/v) Tween-20 and 5 % (w/v) nonfat dry milk, and thereafter probed overnight with primary antibodies (1/3000) in TBS supplemented with 5 % (w/v) nonfat dry milk. After washing, immunostaining was achieved using HRP-conjugated secondary antibodies (1:10,000) and ECL detection (Amersham). Quantification of immunostaining intensity was performed by using Image J software.

RNA interference

Synthetic small interfering RNA (siRNA) duplexes with symmetric 3' deoxythymidine overhangs were used to carry out RNA interference. Macrophages were plated at a density of 1×10^6 cells per well and transfected with siRNA (60 pmoles per well) using INTERFERin (Polyplus, Illkirch, France), according to the manufacturer's recommendations. The following siRNA sequences were designed (Sigma-Aldrich) and tested for their efficiency to silence the expression of HVEM, nectin-2, 3-OST2 and CD147: si-HVEM, 5'-GCGAAGGUCUCACGAGGUCdTdT-3'; si-nectin-2, 5'-GUCACGGUCACCUGCAAAGdTdT-

3'; si-3-OST2, 5'-CGGACAAGCACUUCUAUUUdTdT-3'; si-CD147, 5'-GGUUCUUCGUGAGUCCUCdTdT-3'. A control siRNA duplex (MISSION®, Sigma) was used as negative control.

Immunofluorescence staining

Following differentiation, macrophages were seeded on glass coverslips, washed once with PBS and fixed with 4 % paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) for 30 min at room temperature. Coverslips were then washed three times with PBS, once with 1.5 M NaCl and then with PBS containing 0.1 % saponin. Following blocking in PBS containing 0.5 % BSA and 0.1 % saponin, fixed cells were incubated in the presence of 10 µg/mL of recombinant His-tagged HSV-1 gD (250 nM) (Antibodies-online, Aachen, Germany) in the same buffer, with or without CyPB. After 1 h of incubation at 4°C, HSV-1 gD binding was fluorescently detected by an Alexa 488-conjugated anti-His-tag antibody (1:100, Qiagen) in blocking buffer. Cells were also stained with 500 ng/mL DAPI (Sigma-Aldrich) for 10 min to visualize cell nuclei. Immunostaining was detected with an inverted Zeiss LSM 780 microscope (Oberkochen, Germany) with a 63x oil immersion lens at room temperature. Data were collected using the Zeiss Zen Pro 2.1 software and processed with Image J software.

Statistical analysis

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

Conflicts of interest: No potential conflict of interest was disclosed.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Lille.

Author contributions

MD, FA and AD conceived and designed the experiments, MD, CH, FF, MC and AD performed the experiments, MD, FA and AD analysed the data and wrote the manuscript.

References

1. Esko JD & Selleck SB (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* 71, 435-471.
2. Zhang L (2010) Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci* 93, 1-17.
3. Esko JD & Lindahl U (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* 108, 169-173.
4. 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.
5. Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD *et al.* (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99, 13-22.
6. Xia G, Chen J, Tiwari V, Ju W, Li J-P, Malmstrom A *et al.* (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.
7. Xu D, Tiwari V, Xia G, Clement C, Shukla D & Liu J (2005) Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem J* 385, 451-459.
8. O'Donnell CD, Tiwari V, Oh M-J & Shukla D (2006) A role for heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread. *Virology* 346, 452-459.
9. Tiwari V, O'donnell C, Copeland RJ, Scarlett T, Liu J & Shukla D (2007) Soluble 3-O-sulfated heparan sulfate can trigger herpes simplex virus type 1 entry into resistant Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Gen Virol* 88, 1075-1079.
10. Thacker BE, Xu D, Lawrence R & Esko JD (2014) Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol* 35, 60-72.
11. Spear PG (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 6, 401-410.
12. Tiwari V, Clement C, Xu D, Valyi-Nagy T, Yue BYJT, Liu J *et al.* (2006) Role for 3-O-sulfated heparan sulfate as the receptor for herpes simplex virus type 1 entry into primary human corneal fibroblasts. *J Virol* 80, 8970-8980.
13. Choudhary S, Marquez M, Alencastro F, Spors F, Zhao Y & Tiwari V (2011) Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) entry into human mesenchymal stem cells is heavily dependent on heparan sulfate. *J Biomed Biotechnol* 2011, 2643-2650.
14. Tiwari V, Oh M-J, Kovacs M, Shukla SY, Valyi-Nagy T & Shukla D (2008) Role for nectin-1 in herpes simplex virus 1 entry and spread in human retinal pigment epithelial cells. *FEBS J* 275, 5272-5285.

15. Kopp SJ, Banisadr G, Glajch K, Maurer UE, Grünewald K, Miller RJ *et al.* (2009) Infection of neurons and encephalitis after intracranial inoculation of herpes simplex virus requires the entry receptor nectin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 17916-17920.
16. Shukla ND, Tiwari V & Valyi-Nagy T (2012) Nectin-1-specific entry of herpes simplex virus 1 is sufficient for infection of the cornea and viral spread to the trigeminal ganglia. *Mol Vis* 18, 2711-2716.
17. Medici MA, Sciortino MT, Perri D, Amici C, Avitabile E, Ciotti M *et al.* (2003) Protection by herpes simplex virus glycoprotein D against Fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 278, 36059-36067.
18. Sciortino MT, Medici MA, Marino-Merlo F, Zaccaria D, Giuffrè-Cuculietto M, Venuti A *et al.* (2008) Involvement of gD/HVEM interaction in NF- κ B-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. *Biochem Pharmacol* 76, 1522-1532.
19. Allain F, Vanpouille C, Carpentier M, Slomianny M-C, Durieux S & Spik G (2002) Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2714-2719.
20. Pakula R, Melchior A, Denys A, Vanpouille C, Mazurier J & Allain F (2007) Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* 17, 492-503.
21. Melchior A, Denys A, Deligny A, Mazurier J & Allain F (2008) Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C-delta and p44/42 mitogen-activated protein kinases. *Exp Cell Res* 314, 616-628.
22. Deligny A, Denys A, Marcant A, Melchior A, Mazurier J, van Kuppevelt TH *et al.* (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.
23. Vanpouille C, Denys A, Carpentier M, Pakula R, Mazurier J & Allain F (2004) Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of cyclophilin B to heparin and cell surface heparan sulphate. *Biochem J* 382, 733-740.
24. Vanpouille C, Deligny A, Delehède M, Denys A, Melchior A, Liénard X *et al.* (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.
25. Liu J, Shriver Z, Blaiklock P, Yoshida K, Sasisekharan R & Rosenberg RD (1999) Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues. *J Biol Chem* 274, 38155-38162.

26. Liu J, Shriver Z, Pope RM, Thorp SC, Duncan MB, Copeland RJ *et al.* (2002) Characterization of a heparan sulfate octasaccharide that binds to herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *J Biol Chem* 277, 33456-33467.
27. Marcant A, Denys A, Melchior A, Martinez P, Deligny A, Carpentier M *et al.* (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.
28. Martinez P, Denys A, Delos M, Sikora A-S, Carpentier M, Julien S *et al.* (2015) Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* 25, 502-513.
29. Patel VN, Lombaert IMA, Cowherd SN, Shworak NW, Xu Y, Liu J *et al.* (2014) Hs3st3-modified heparan sulfate controls KIT⁺ progenitor expansion by regulating 3-O-sulfotransferases. *Dev Cell* 29, 662-673.
30. Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn K W & Pommier Y (1994) Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res* 211, 314-321.
31. Kiener PA, Davis PM, Starling GC, Mehlin C, Klebanoff SJ, Ledbetter JA *et al.* (1997) Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med* 185, 1511-1516.
32. MacLeod IJ & Minson T (2010) Binding of herpes simplex virus type-1 virions leads to the induction of intracellular signalling in the absence of virus entry. *PLoS ONE* 5, e9560.
33. Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA *et al.* (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
34. Sciortino MT, Medici MA, Marino-Merlo F, Zaccaria D, Giuffrè-Cuculitto M, Venuti A *et al.* (2008) Involvement of HVEM receptor in activation of nuclear factor kappaB by herpes simplex virus 1 glycoprotein D. *Cell Microbiol* 10, 2297-2311.
35. Yurchenko V, O'Connor M, Dai WW, Guo H, Toole B, Sherry B & Bukrinsky M. (2001) CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 786-788.
36. Arora K, Gwinn WM, Bower MA, Watson A, Okwumabua I, MacDonald HR *et al.* (2005) Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol* 175, 517-522.
37. Yurchenko V, Constant S, Eisenmesser E & Bukrinsky M (2010) Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol* 160, 305-317.
38. Xiong L, Edwards CK & Zhou L (2014) The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: a review of the current scientific literature. *J Mol Sci* 15, 17411-17441.

39. Cantor JM & Ginsberg MH (2012) CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. *J Cell Sci* 125, 1373-1382.
40. Oh Y, Jeong K, Kim K, Lee YS, Jeong S, Kim SS *et al.* (2016) Cyclophilin B protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells against MPP(+)-induced neurotoxicity via JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 478, 1396-1402.
41. Oh Y, Kim EY, Kim Y, Jin J, Jin BK, Jahng GH *et al.* (2011) Neuroprotective effects of overexpressed cyclophilin B against A β -induced neurotoxicity in PC12 cells. *Free Radic Biol Med* 51, 905-920.
42. Murphy KM, Nelson CA & Sedý JR (2006) Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat Rev Immunol* 6, 671-681.
43. Kaye S & Choudhary A (2006) Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* 25, 355-380.
44. Akhtar J & Shukla D (2009) Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J* 276, 7228-7236.
45. Yu X & He S (2016) The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways. *Virology* 13, 77-84.
46. Lindahl U (2007) Heparan sulfate-protein interactions: a concept for drug design? *Thromb Haemost* 98, 109-115.
47. Copeland R, Balasubramaniam A, Tiwari V, Zhang F, Bridges A, Linhardt RJ *et al.* (2008) Using a 3-O-sulfated heparin octasaccharide to inhibit the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochemistry* 47, 5774-5783.
48. Tiwari V, Liu J, Valyi-Nagy T & Shukla D (2011) Anti-heparan sulfate peptides that block herpes simplex virus infection in vivo. *J Biol Chem* 286, 25406-25415.
49. Carpentier M, Allain F, Haendler B, Denys A, Mariller C, Benaïssa M & Spik G (1999) Two distinct regions of cyclophilin B are involved in the recognition of a functional receptor and of glycosaminoglycans on T lymphocytes. *J Biol Chem* 274, 10990-10998.
50. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002-2007.

4. Discussion

Grâce à leur capacité d'interaction avec de nombreux ligands protéiques, les HS jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. La diversité structurale des HS est due à une cascade de modifications enzymatiques réalisées au cours de la phase de maturation. La dernière étape de ce processus est la 3-O-sulfatation des résidus de GlcN, qui est réalisée par les 3-OSTs (Esko and Lindhal. 2001 ; Esko and Selleck. 2002 ; Mochizuki *et al.*, 2008). Même si cette réaction peut être catalysée par sept isoenzymes chez l'Homme, elle n'en demeure pas moins la modification la plus rare des HS, et peu de ligands des héparanes 3-O-sulfatés ont été décrits à ce jour (Thacker *et al.*, 2014). Parmi ces ligands, la protéine gD du virus HSV-1 et la CyPB ont fait l'objet de nombreuses études, qui ont démontré que leurs activités sont dépendantes des héparanes 3-O-sulfatés (Shukla *et al.*, 1999 ; Vanpouille *et al.*, 2007 ; Deligny *et al.*, 2010). L'interaction entre la protéine gD et ses différents récepteurs est nécessaire à la fusion membranaire entre le virus et ses cellules cibles, ce qui est une étape cruciale dans le processus infectieux. En complément, la protéine gD apparaît être la principale protéine de l'enveloppe de HSV-1 impliquée dans l'activation de voies annexes par le virus. Ainsi, une forme soluble de la protéine gD est aussi efficace que la particule virale pour protéger les cellules myéloïdes U937 contre l'apoptose (Medici *et al.*, 2003 ; Sciortino *et al.*, 2008). La protéine gD est également capable de moduler l'expression de gènes impliqués dans les processus anti-apoptotiques dans des fibroblastes primaires, ce qui entraîne une augmentation de la survie cellulaire (MacLeod and Minson. 2010). Des travaux réalisés au Laboratoire ont démontré que la CyPB est en capacité d'atténuer les réponses pro-inflammatoires des macrophages primaires (Marcant *et al.*, 2012). Dans ce contexte, nous avons souhaité vérifier si la protéine gD et la CyPB pouvaient partager les mêmes réponses cellulaires dans les macrophages dérivés des monocytes du sang.

Dans un premier temps, nous avons confirmé que la protéine gD recombinante induit l'activation des voies de signalisation NF- κ B, PI3-K/Akt et Erk/MAPK et protège les macrophages primaires contre l'apoptose induite par la staurosporine. Nous avons également observé une augmentation de l'expression des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL, ainsi qu'une diminution de l'expression du gène pro-apoptotique Bcl-XS, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment. En parallèle, nous avons démontré que la CyPB est capable d'induire les mêmes réponses anti-apoptotiques dans les macrophages. Les travaux précédents du Laboratoire avaient démontré une activation des voies de signalisation NF- κ B, PI3-K/Akt et Erk/MAPK dans les macrophages stimulés par la CyPB (Marcant *et al.*, 2012). Cette étude nous a permis d'élargir nos connaissances sur les propriétés de la CyPB. Ainsi, en plus de ses activités régulatrices dans un contexte

inflammatoire, nos résultats indiquent que la CyPB induit les mêmes réponses anti-apoptotiques que la protéine gD dans les macrophages.

Le virus HSV-1 peut infecter ses cellules cibles *via* des interactions avec diverses molécules membranaires, telles que les nectines-1 et -2, HVEM et les héparanes 3-O-sulfatés. En raison de ce large choix, HSV-1 possède un tropisme d'infection très large avec une importance relative des différents récepteurs selon le type cellulaire. Ainsi, la nectine-1 est suffisante pour l'infection des cellules épithéliales et neuronales (Tiwari *et al.*, 2008 ; Shukla *et al.*, 2012). A l'inverse, les héparanes 3-O-sulfatés sont requis pour l'infection des cellules n'exprimant pas ou peu la nectine-1, telles que les cellules myéloïdes et les fibroblastes (Shukla *et al.*, 1999 ; Tiwari *et al.*, 2006 ; Choudhary *et al.*, 2011).

Nous avons alors analysé les profils d'expression des différentes 3-OSTs et des récepteurs de la protéine gD dans les macrophages primaires. Nous avons observé que HVEM est fortement exprimé dans ces cellules, alors que la nectine-2 est présente à un taux très faible. En accord avec nos précédents résultats (Martinez *et al.*, 2015), nous avons confirmé que la 3-OST2 est très largement exprimée dans les macrophages, ce qui suggère que la 3-OST2 soit à l'origine de la génération de la plupart des motifs HS 3-O-sulfatés présents à la surface des macrophages.

Afin d'identifier les mécanismes responsables des réponses anti-apoptotiques induites par protéine gD, nous avons décidé d'utiliser une approche par ARN interférence.

L'inactivation de la 3-OST2 dans les macrophages réduit considérablement les capacités de la protéine gD et de la CyPB à activer les voies de signalisation PI3-K/Akt et Erk/MAPK et à moduler l'expression de Bcl-2, Bcl-XL et Bcl-XS. De plus, l'effet protecteur des deux protéines contre l'apoptose induite par la staurosporine est considérablement réduit. Ces résultats indiquent que les réponses médiées par la protéine gD et la CyPB sont dépendantes de l'interaction avec des héparanes 3-O-sulfatés. En outre, nous avons montré que la fixation de la protéine gD à la surface des macrophages est fortement inhibée en présence d'un excès de CyPB. Cette observation suggère que les héparanes 3-O-sulfatés nécessaires à la fixation des deux protéines sont probablement les mêmes.

En parallèle, nous avons montré que l'inactivation de HVEM réduit considérablement les réponses anti-apoptotiques induites par la protéine gD et par la CyPB dans les macrophages, alors que celle de la nectine-2 n'a pas d'effet notable. Ces résultats indiquent que HVEM participe à l'activation des voies de signalisation induites par la protéine gD et contribue à ses propriétés anti-apoptotiques. De plus, nos données révèlent que HVEM et les héparanes 3-O-sulfatés ne possèdent pas d'activités redondantes. En effet, l'absence de 3-O-sulfatation des HS est suffisante pour inhiber l'activité de la protéine gD malgré l'expression de HVEM. A l'inverse, les héparanes 3-O-sulfatés ne peuvent pas compenser l'absence de HVEM. Ces observations suggèrent un modèle dans lequel la protéine gD interagit avec un complexe de

signalisation, formé par HVEM et les héparanes 3-O-sulfatés à la surface des macrophages. De manière surprenante, l'invalidation de HVEM inhibe également les réponses induites par la CyPB. Ce résultat était inattendu puisque HVEM n'a jamais été décrit pour être un récepteur fonctionnel de la CyPB. Par contre, nous avons vérifié que le CD147, initialement décrit comme un co-récepteur de la CyPB impliqué dans ses propriétés pro-migratoires (Allain *et al.*, 2002), n'est pas nécessaire pour induire une réponse anti-apoptotique. Dans leur ensemble, nos résultats démontrent, pour la première fois, que la protéine gD du virus HSV-1 et la CyPB partagent les mêmes propriétés protectrices en interagissant avec des sites de fixation communs à la surface des macrophages.

En plus de leur activité anti-apoptotique, la protéine gD et la CyPB ont toutes les deux été décrites pour posséder des propriétés anti-inflammatoires. Une précédente étude menée au Laboratoire a démontré que la CyPB est capable d'atténuer les réponses pro-inflammatoires des macrophages, *via* un mécanisme dépendant de l'expression de Bcl-3 (Marcant *et al.*, 2012). Quant à la protéine gD, elle interagit avec HVEM au niveau du même site de fixation que son ligand naturel BTLA (*B- and T-lymphocyte attenuator*). Ainsi, le virus détourne le phénomène de tolérance induit par l'interaction entre HVEM et BTLA, ce qui va réduire la réponse immunitaire de l'hôte (Murphy *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant de vérifier si les héparanes 3-O-sulfatés coopèrent également avec HVEM dans les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire induits par la protéine gD.

Le virus HSV-1 peut être à l'origine de complications neurologiques et oculaires chez les nourrissons et les individus immunodéprimés. Les kératites herpétiques oculaires sont la cause principale de cécité dans les pays développés. Elles sont dues à une prolifération des fibroblastes et un état inflammatoire chronique, qui est maintenu par le recrutement et la survie des macrophages activés au niveau de la lésion (Kaye and Choudhary. 2006 ; Tiwari *et al.*, 2006). Outre leur implication dans le processus d'entrée du virus (Shukla *et al.*, 1999 ; Tiwari *et al.*, 2006 ; Akhtar and Shukla. 2009), nos résultats montrent que les héparanes 3-O-sulfatés sont également nécessaires à la protéine gD pour induire des signaux anti-apoptotiques dans les macrophages. Ainsi, cette étude permet de mieux comprendre l'implication de la protéine gD du virus HSV-1 dans le maintien de l'état inflammatoire chronique des macrophages lors des kératites herpétiques oculaires.

En raison de leur rôle dans les processus d'entrée du virus et de protection contre l'apoptose, les héparanes 3-O-sulfatés représentent une cible thérapeutique intéressante. Dans ce contexte, Copeland *et al.* (2008) ont utilisé des oligosaccharides d'héparine 3-O-sulfatés pour bloquer avec succès l'entrée du virus dans des fibroblastes de cornée. Une autre étude réalisée *in vivo* a montré que des peptides basiques capables de bloquer l'interaction entre les héparanes 3-O-sulfatés et la protéine gD réduit efficacement les atteintes oculaires. Dans cette étude, deux groupes de peptides possédant des résidus d'acides aminés basiques

positionnés soit de manière alternée (G1) ou regroupée (G2) ont été synthétisés. De manière intéressante, les peptides G2 se sont révélés être plus efficaces pour inhiber l'entrée du virus que des oligosaccharides 3-O-sulfatés (Tiwari *et al.*, 2011). De précédentes études menées au Laboratoire ont démontré que le domaine de fixation aux héparanes 3-O-sulfatés est situé au niveau de l'extrémité *N*-terminale de la CyPB, qui est spécifique de cette protéine au sein de la famille des cyclophilines (Carpentier *et al.*, 1999 ; Vanpouille *et al.*, 2007). Ce domaine contient deux clusters d'acides aminés (¹⁴YFD¹⁶ and ³KKK⁵) directement impliqués dans la fixation d'un motif HS octasaccharidique. Dans l'hypothèse où la protéine gD utilise les récepteurs de la CyPB pour induire la même réponse anti-apoptotique, un peptide synthétique mimant l'extrémité *N*-terminale de la protéine pourrait être efficace pour inhiber spécifiquement les réponses induites par HSV-1 dans les macrophages primaires.

Partie 2: Etude des variations d'expression des 3-OST2 et 3-OST3B dans les monocytes/macrophages

1. Les macrophages: acteurs importants de la réponse immunitaire

Les macrophages jouent un rôle important dans les réponses immunitaires innées et adaptatives et participent au maintien de l'homéostasie tissulaire. Leurs fonctions furent longtemps réduites à la clairance et à l'élimination d'agents pathogènes, mais elles s'avèrent beaucoup plus complexes. En effet, les macrophages ne sont pas simplement des cellules douées d'une activité phagocytaire mais assurent aussi de nombreuses autres fonctions, leur permettant de participer d'une part à l'élimination d'agents pathogènes mais également au processus de réparation tissulaire et de régulation de l'inflammation.

1.1 La polarisation des macrophages

En raison de leur grande plasticité, les macrophages peuvent adapter leurs fonctions selon l'environnement tissulaire. En présence de ligands des TLRs et d'IFN- γ , ils subissent une activation "classique" de type M1, qui se caractérise par une capacité microbicide élevée et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires. En revanche, en présence d'IL-4 et d'IL-13, ils sont dirigés vers une polarisation "alternative" de type M2. Les macrophages M2 jouent un rôle dans la réparation tissulaire et la résolution de l'inflammation, mais ils ont également été identifiés dans de nombreuses pathologies, telles que les allergies, l'athérosclérose et de nombreux cancers (Mantovani and Sica, 2010). Toutefois, la classification M1/M2 est réductrice puisqu'il est maintenant admis qu'il existe *in vivo* un grand nombre d'états intermédiaires, possédant des fonctions différentes.

La polarisation des macrophages entraîne de nombreux changements à la fois au niveau de l'expression de récepteurs membranaires modulant les réponses immunitaires et dans la sécrétion de cytokines (Tableau 8). Ainsi les macrophages M1 expriment fortement des récepteurs impliqués dans la présentation des antigènes alors que les macrophages M2 surexpriment des récepteurs possédant des propriétés anti-inflammatoires et des fonctions dans le remodelage tissulaire (Martinez *et al.*, 2006).

Tableau 8: Exemples de molécules exprimées par les macrophages M1/M2

| | Macrophages M1 | Macrophages M2 |
|-------------------------|--|---------------------|
| Récepteurs membranaires | CMH-II, CD80, CD86 | DC-SIGN, MRC1 |
| Cytokines | TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 | IL-10, TGF- β |
| Chimiokines | CXCL10, CCL2 | CCL18, CCL22 |

1.2 Mécanismes moléculaires régulant la polarisation des macrophages

Les différences d'expression observées entre les différents types de macrophages nécessitent la mise en place d'importants mécanismes de régulation. Ainsi, il a été démontré que l'expression des récepteurs membranaires et la sécrétion des cytokines sont finement régulées par des mécanismes transcriptionnels, épigénétiques et post-transcriptionnels (Ivashkiv, 2013; Molawi and Sieweke, 2013; Tugal *et al.*, 2013). Les voies de signalisation cellulaires activées par les stimuli de polarisation entraînent la modulation de l'expression et/ou de l'activation d'un grand nombre de facteurs de transcription (Tableau 9).

Tableau 9: Facteurs de transcription impliqués dans la polarisation des macrophages

| Nom | Rôle |
|--|--|
| Facteurs de transcription inducteurs de la polarisation M1 | |
| NF-κB | Activé par les stimuli pro-inflammatoires |
| STATs | STAT1 : activé par l'IFN-γ ; favorise la transcription de iNOS et de l'IL-12 STAT1/2 : activés par les IFNs de type I et les agonistes des TLRs |
| AP-1 | Activé par les stimuli pro-inflammatoires ; induit la transcription de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α) |
| IRFs | IRF3 : activé par les agonistes des TLRs ; induit la transcription de l'IFN-β IRF5 : induit la transcription de l'IL-12 IRF9 : activé par l'IFN-β ; interagit avec STAT2 |
| HIFs | HIF-1α : induit par NF-κB ; régule de l'activité de iNOS |
| Facteurs de transcription inducteurs de la polarisation M2 | |
| STAT | STAT6 : activé par l'IL-4 et l'IL-13 ; induit la transcription du facteur de transcription KLF4 et des récepteurs nucléaires PPARs |
| IRFs | IRF4 : activé par des agents parasitaires et fongiques |
| HIFs | HIF-2α : inhibe la production de NO |
| PPARs | PPAR-γ : associé au complexe répresseur NCoR ; bloque l'activité transcriptionnelle des facteurs STATs, NFκB et AP-1 PPAR-δ : induit par la voie IL-4/STAT6 |
| KLFs | KLF4 : induit par IL-4 ; favorise la transcription du gène <i>Arg1</i> |
| GRs | Inhibent la signalisation induite par NF-κB et AP-1 |

AP-1: Activated protein-1; Arg1: Arginase 1; GR: Glucocorticoid receptor; HIF: Hypoxia inducible factor; IFN: Interféron ; IRF: IFN-recognition factor ; KLF: Krüppel-like factor; NF-κB: Nuclear factor of κB ; PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor ; STAT: Signal transducer and activator of transcription ; TLR: Toll-like receptor ; TNF: Tumor necrosis factor. D'après Tugal et al., 2013.

Les microARNs (miRNAs) sont de petits ARN non codants capables de moduler l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. La régulation des réponses inflammatoires et immunitaires par des miRNAs connaît un intérêt grandissant. En outre, les

différentes études menées démontrent que les miRNAs possèdent des profils d'expression dépendants du type cellulaire et de l'environnement. Ainsi, les différents stimuli de polarisation affectent l'expression de nombreux miRNAs, ce qui entraîne des variations d'expression génique au sein des deux types de macrophages (Tableau 10).

Tableau 10: microARNs impliqués dans la polarisation des macrophages

| micro ARN | Cible | Effets observés |
|------------|----------------------|--|
| miR-9 | NF-κB | Activé par le LPS ; impliqué dans le rétrocontrôle négatif de la signalisation induite par le TLR4 |
| miR-21 | PDCD4 | Activé par le LPS ; inhibe la sécrétion d'IL-6 et induit la sécrétion d'IL-10 impliqué dans le rétrocontrôle négatif de la signalisation induite par le TLR4 |
| miR-27b | PPAR-γ | Inhibe l'expression de PPAR-γ ; active les réponses induites par le LPS |
| miR-105 | TLR2 | Inhibe l'expression et les réponses induites par le TLR2 |
| miR-106a | IL-10 | Inhibe la sécrétion d'IL-10 |
| miR-187 | TNF-α ; IL-6 ; IL-12 | Activé par l'IL-10 ; inhibe la sécrétion de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-12 |
| miR-378-3p | Arg1 | Activé par l'IL-4 ; inhibe l'expression de <i>Arg1</i> ; impliqué dans le rétrocontrôle négatif de la signalisation induite par l'IL-4 |
| miR-511-3p | Rock2 | Activé par l'IL-4 ; augmente l'expression de <i>Rock2</i> ; impliqué dans le rétrocontrôle négatif de la signalisation induite par l'IL-4 |

Arg1: Arginase 1; *NF-κB*: Nuclear factor κB; *PDCD4*: Programmed Cell Death 4; *PPAR*: Peroxisome proliferator-activated receptor; *Rock2*: Rho-associated coiled-coil kinase 2; *TLR*: Toll-like receptor; *TNF*: Tumor necrosis factor. D'après Liu *et al.*, 2013; Squadrito *et al.*, 2013.

Les mécanismes épigénétiques régulant la polarisation des macrophages incluent des phénomènes de remodelages de la chromatine par modification des protéines se liant à l'ADN (phosphorylation, méthylation et/ou acétylation), ainsi que par méthylation d'ilots CpG situés sur certains gènes. Par exemple, il a été démontré que l'inhibition des HDACs (*Histone Deacetylases*) réduit considérablement la sécrétion de TNF-α et d'IL-6 induite par le LPS et l'IFN-γ (Van den Bossche *et al.*, 2014a). Lors de la polarisation M2, l'expression de l'histone déméthylase JMJD3 est augmentée par la voie IL-4/STAT6 (Ishii *et al.*, 2009). Les auteurs suggèrent que la modification des histones catalysée par JMJD3 faciliterait l'expression de facteurs de transcription entraînant la polarisation M2, tels que IRF4, mais également la transcription de gènes nécessaires à leur fonction, par exemple le gène *Arg1* codant pour l'arginase-1 (Mullican *et al.*, 2011).

1.3 Régulation des voies métaboliques des macrophages M1/M2

Les différents mécanismes de régulation mentionnés ci-dessus sont à l'origine des nombreux changements phénotypiques des macrophages, mais ils vont également influencer le fonctionnement de nombreuses voies métaboliques. Les macrophages polarisés montrent une régulation différente des métabolismes du fer, du glucose, des lipides, de certains acides aminés ou encore du glutathion. Concernant le métabolisme du fer, les macrophages M1 ont tendance à séquestrer le fer par une expression forte de la ferritine, ce qui favorise leur activité bactériostatique et anti-tumorale. A l'inverse, l'export de fer est favorisé dans les macrophages M2, puisqu'ils expriment fortement la ferroportine et le récepteur CD163, ce qui favorise les mécanismes de remodelage tissulaire et de tolérance immunitaire (Cairo *et al.*, 2011). Les macrophages polarisés régulent également différemment leur métabolisme énergétique. Ainsi, les macrophages M1 favorisent la voie anaérobie de la glycolyse, en exprimant de manière préférentielle l'isoforme uPFK2 (*ubiquitous 6-Phosphofructo-2-Kinase 2*) qui est beaucoup plus active que L-PFK2 (*Liver 6-Phosphofructo-2-Kinase 2*), ce qui maintient une concentration importante en fructose-2,6-diphosphate (Rodríguez-Prados *et al.*, 2010). En revanche, les macrophages M2 préfèrent l'oxydation des acides gras, ce qui leur confère un apport énergétique prolongé nécessaire lors des processus de remodelage tissulaire (Odegaard and Chawla, 2011).

Les macrophages sécrètent de nombreux médiateurs lipidiques impliqués dans la modulation de la réponse inflammatoire. Les travaux de Martinez *et al.* (2006) ont montré que l'expression de deux enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique, COX-2 (Cyclo-Oxygénase 2) et mPGES (*microsomal Prostaglandin E Synthase*) sont fortement exprimées en réponse à des stimuli pro-M1, ce qui entraîne la synthèse de lipides pro-inflammatoires. A l'inverse, l'expression de ces deux enzymes est réprimée dans les macrophages M2, au profit de l'expression de COX-1 et ALOX-15 (*Arachidonate 15-Lipoxygenase*), qui sont impliquées dans la synthèse de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires (Mosca *et al.*, 2007). Le métabolisme de l'arginine est également modifié suite à la polarisation. En effet, l'expression forte de NOS2 (*Nitric Oxide Synthase 2*) dans les macrophages M1 favorise la production d'oxyde nitrique, qui est un effecteur important pour leur activité microbicide. Quant aux macrophages M2, ils expriment l'arginase-1, qui synthétise des polyamines nécessaires à la formation des réseaux de collagène et au remodelage tissulaire (Geelhaar-Karsch *et al.*, 2013).

Finalement, l'expression différentielle du glutathion dans les macrophages polarisés influence les mécanismes oxydo-réducteurs. Alors que le glutathion est présent en grande quantité dans les macrophages M1, il est totalement absent des macrophages M2. Par conséquent, l'environnement des macrophages M1 est plus réducteur, ce qui favorise leur activité microbicide (Murata *et al.*, 2002).

2. Travaux de recherche

En raison de leur capacité à interagir avec un vaste répertoire de ligands protéiques, les HS régulent de nombreux processus biologiques. Leur diversité structurale est dépendante de l'activité de nombreuses enzymes catalysant les différentes étapes de maturation du précurseur glycanique. Or, l'expression de ces enzymes varie en fonction du type cellulaire et/ou de l'environnement cellulaire. Comme mentionné précédemment, la polarisation des macrophages entraîne de profonds changements au niveau du fonctionnement des voies métaboliques. Il est donc probable que la machinerie de biosynthèse des HS soit modifiée au cours de la polarisation des macrophages. Les premiers travaux réalisés dans l'Equipe sur les macrophages ont donc été consacrés à la vérification de cette hypothèse. Les résultats montrent une expression forte de la 3-OST3B dans les macrophages M1, alors que l'enzyme est très peu exprimée dans les macrophages M2. A l'inverse, la 3-OST2 est fortement exprimée dans les macrophages M2 et quasi indétectable dans les macrophages M1. Ces premiers résultats ont fait l'objet d'une publication parue dans *Glycobiology* en 2015 :

Martinez P., Denys A., **Delos M.**, Sikora A.S., Carpentier M., Julien S., Pestel J. and Allain F. «**Differential macrophage polarization alters the expression profile of glycosaminoglycans**» (Annexe 1).

Sur la base de cette étude, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires à l'origine des variations d'expression des 3-OST2 et 3-OST3B dans les macrophages en réponse aux stimuli de polarisation M1. Nous avons également participé à une étude réalisée en parallèle portant sur la régulation de l'expression de la 3-OST3B dans les monocytes stimulés en présence de LPS. Ces derniers travaux ont fait l'objet d'une publication parue dans *Journal of Cellular Biochemistry* en 2016 :

Sikora AS., **Delos M.**, Martinez P., Carpentier M., Allain F and Denys A. «**Regulation of the expression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by inflammatory stimuli in Human monocytes** » (Annexe 2).

Alors que l'expression de la 3-OST3B est régulée dans les macrophages M1 de façon similaire à ce qui est observé dans les monocytes, nos résultats montrent que la chute rapide du taux de transcrits de la 3-OST2 serait liée à un arrêt brutal de la transcription combiné à l'action de microARN

3. Résultats

3.1 Expression des 3-OSTs de type gD dans les macrophages M1/M2

La polarisation des macrophages s'accompagne de profonds changements phénotypiques et métaboliques. Les travaux réalisés au Laboratoire se sont intéressés aux effets induits par la polarisation de ces cellules sur la machinerie de biosynthèse des HS. Pour cela, les macrophages dérivés de monocytes de sang humain ont été stimulés *in vitro* soit par la combinaison LPS/IFN- γ inducteur d'une polarisation M1, soit par l'association des cytokines IL-4 et IL-13, connue pour diriger les macrophages vers un phénotype M2. Après avoir vérifié que ces deux modes d'activation induisent bien les phénotypes attendus en mesurant l'expression de marqueurs spécifiques, l'expression des 3-OSTs de type gD a été analysée dans les macrophages par RT-qPCR. Alors que les macrophages non différenciés M0 expriment majoritairement la 3-OST2, les 3-OST1, 3A, 3B et 6 sont faiblement exprimées et les 3-OST4 et 5 ne sont pas détectées. L'analyse de l'expression des 3-OSTs dans les macrophages polarisés montre d'importantes variations d'expression pour les 3-OST2 et 3-OST3B. Le taux d'expression de la 3-OST3B est fortement augmenté dans les macrophages M1, alors que celui de la 3-OST2 chute drastiquement. A l'inverse, la polarisation M2 ne réduit le niveau d'expression d'aucune enzyme, mais induit une augmentation de l'expression de la 3-OST2 (Figure 19).

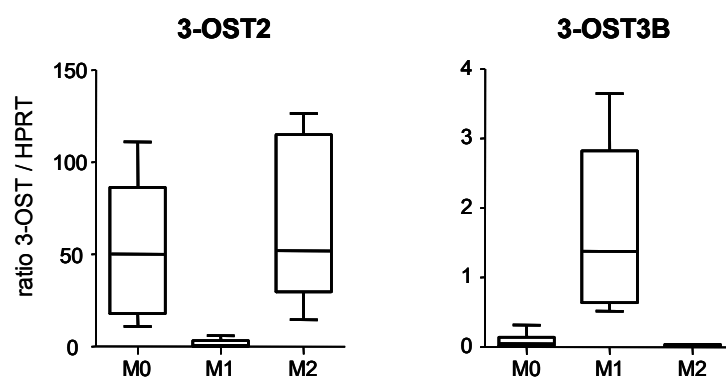


Figure 19: Profils d'expression des 3-OST2 et 3-OST3B dans les macrophages primaires humains après polarisation M1 et M2. D'après Martinez *et al.*, 2015.

Afin de confirmer que les variations d'expression des ARNm sont associées à des modifications de l'expression protéique des enzymes, des expériences de Western-Blot ont été réalisées en utilisant des lysats cellulaires issus de macrophages M1 et M2. Les résultats montrent un immuno-marquage de la 3-OST3B dans les deux types de macrophages, avec une plus forte intensité dans les macrophages M1. A l'inverse, l'expression protéique de la 3-OST2 est uniquement détectée dans les macrophages M2 (Figure 20). Ainsi, l'expression différentielle des ARNm codant pour les 3-OST2 et 3B se

traduit bien par des variations d'expression des protéines correspondantes dans les deux types de macrophages. Dans leur ensemble, ces résultats montrent une balance entre la forte expression de la 3-OST2 dans les macrophages M2, qui est remplacée par la 3-OST3B au cours de la polarisation M1.

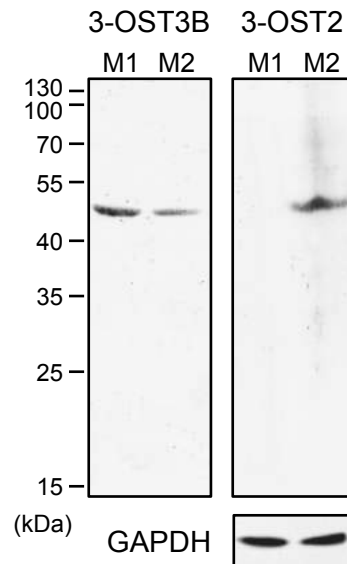


Figure 20: Expression protéique des 3-OST2 et 3-OST3B dans les macrophages polarisés. D'après Martinez *et al.*, 2015.

3.2 Régulation de l'expression de la 3-OST3B dans les monocytes/macrophages par des stimuli pro-inflammatoires

3.2.1 Cinétique d'expression de la 3-OST3B dans les monocytes/macrophages

En se basant sur l'observation que les stimuli pro-inflammatoires induisent l'expression de la 3-OST3B dans les macrophages humains, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires à l'origine de l'augmentation d'expression de cette enzyme.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une cinétique d'expression des transcrits codant pour la 3-OST3B. Pour cette étude, des monocytes primaires ont été différenciés *in vitro* par ajout de M-CSF pendant 5 jours. La polarisation M1 des macrophages a ensuite été initiée par traitement en présence d'IFN- γ et/ou de LPS. Aux temps indiqués, les cellules ont été récupérées et l'expression des transcrits a été analysée par RT-qPCR. Les résultats montrent que l'expression des transcrits de la 3-OST3B est augmentée environ 40 fois après 4 h de stimulation par le LPS seul. Alors que l'association avec l'IFN- γ a un effet positif sur l'augmentation d'expression de la 3-OSTB, le traitement par la cytokine seule n'a en revanche aucun effet (Figure 21A). Ces résultats suggèrent que les variations d'expression de la 3-OST3B observées au cours de la polarisation M1 sont majoritairement dépendantes de la fixation du LPS sur son récepteur TLR4. En parallèle, nous avons étudié les variations

d'expression de la 3-OST3B en réponse aux mêmes stimuli pro-inflammatoires dans les monocytes primaires humains (Sikora *et al.*, 2016). La cinétique d'expression des transcrits codant pour la 3-OST3B montre le même profil que celle obtenue avec les macrophages. L'expression des transcrits de la 3-OST3B est augmentée environ 7 fois après 4 h de stimulation par le LPS. Puis, le taux d'ARNm diminue progressivement au cours du temps. Comme observé dans les macrophages, le traitement des monocytes par l'IFN- γ n'a pas non plus d'effet notable sur l'expression de la 3-OST3B (Figure 21B). Les mêmes résultats ont été obtenus avec la lignée myéloïde THP1, qui sera utilisée pour la suite des investigations concernant les monocytes. Dans leur ensemble, ces premiers résultats suggèrent que l'augmentation d'expression de la 3-OST3B induite par les facteurs inflammatoires implique probablement l'activation des mêmes mécanismes transcriptionnels dans les monocytes et les macrophages.

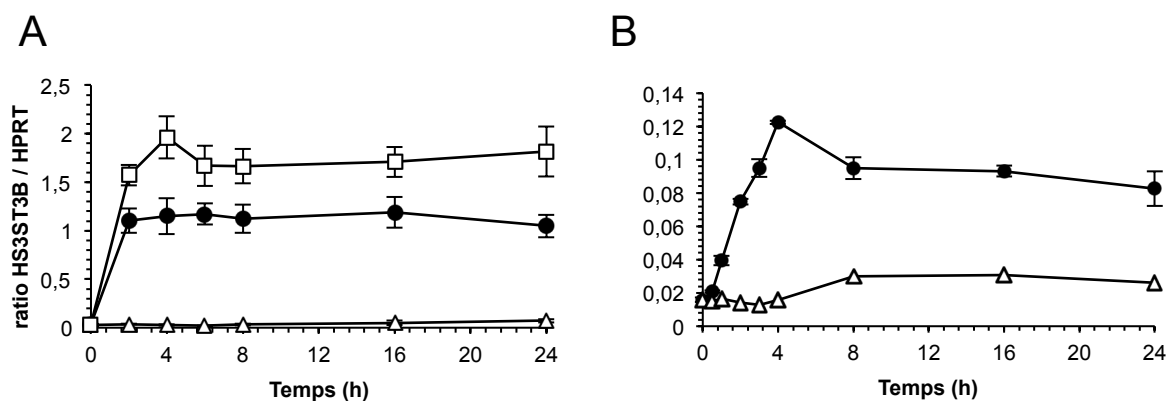


Figure 21: Effets des stimuli de polarisation M1 sur l'expression de l'ARNm codant pour la 3-OST3B dans les macrophages et monocytes primaires humains. (A) Les macrophages ont été stimulés en présence de LPS (●) ou d'IFN- γ (△) seuls ou ajoutés simultanément à raison de 10 ng/mL pour chaque stimulus (□). Aux temps indiqués, les cellules ont été collectées et l'expression des transcrits de la 3-OST3B a été analysée par RT-qPCR. L'expression du transcrite de l'HPRT a été utilisée pour normaliser les données. Les valeurs sont des moyennes de triplicates obtenues à partir de 5 expériences distinctes réalisées avec différents donneurs. **(B)** La cinétique d'expression des ARNm de la 3-OST3B a été analysée par RT-qPCR après stimulation par le LPS (●) ou d'IFN- γ (△) (10 ng/mL pour chacun) dans les monocytes primaires.

3.2.2 Voies de signalisation impliquées dans l'induction de la 3-OST3B

Le LPS est un inducteur de réponses pro-inflammatoires dont l'activité est dépendante de voies de signalisation conduisant notamment à l'activation du facteur de transcription NF-KB et des voies MAPK, ces dernières entraînant l'activation de Erk1/2, JNK et p38 MAPK. Afin d'identifier les voies de signalisation impliquées dans l'augmentation d'expression de la 3-OST3B, les macrophages et les cellules THP1 ont été prétraitées pendant 1 h avec des inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation de NF-KB, Erk1/2,

JNK et p38 MAPK, avant d'être stimulées par le LPS pendant 4 h pour les cellules THP1 et par le mélange LPS/IFN- γ pendant 6 h dans le cas des macrophages.

En premier lieu, nous avons vérifié que le niveau basal d'expression de la 3-OST3B n'est pas affecté en présence des différents inhibiteurs pour les deux types cellulaires. En revanche, après 6 h de stimulation des macrophages, l'inhibiteur de la voie NF-KB diminue d'environ 50 % l'expression de la 3-OST3B induite le mélange LPS/IFN- γ . Les résultats montrent également une réduction importante de l'expression de l'enzyme après 4 h de stimulation des cellules THP1 par le LPS, ce qui suggère que l'activation de la voie NF-KB est importante pour induire la transcription rapide du gène codant pour la 3-OST3B dans les deux types cellulaires. Les inhibiteurs ciblant JNK et p38 MAPK réduisent également d'environ 50 % l'expression de la 3-OST3B induite par le mélange LPS/IFN- γ dans les macrophages et par le LPS dans les cellules THP1. En revanche, l'inhibition de Erk1/2 ne change pas de manière significative l'expression de la 3-OST3B dans les deux types cellulaires (Figure 22). Dans leur ensemble, les résultats montrent que l'augmentation rapide de l'expression de la 3-OST3B est dépendante de l'activation des voies de signalisation de NF-KB, p38 MAPK et JNK.

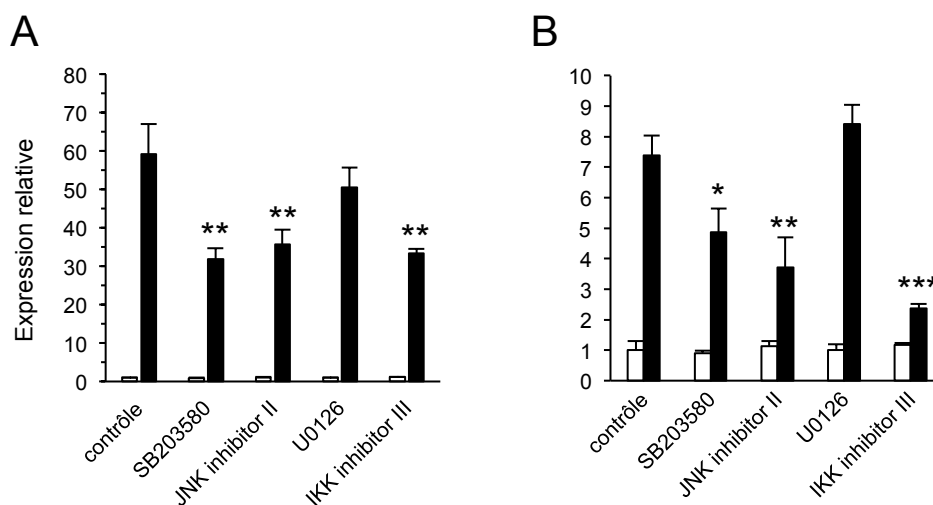


Figure 22: Effets des inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation sur l'expression de l'ARNm codant pour la 3-OST3B dans les macrophages et dans les cellules THP1. (A) Les macrophages ont été prétraités ou non pendant 1 h en présence d'inhibiteurs de p38 MAPK (SB203580), JNK (JNK inhibitor II), Erk1/2 (U0126) et NF-KB (IKK inhibitor III). Puis les cellules ont été stimulées ou non par l'association LPS/IFN- γ (10 ng/mL pour chacun) pendant 6 h. Les cellules ont été collectées et l'expression des transcrits de la 3-OST3B a été analysée par RT-qPCR. L'expression du transcrit de l'HPRT a été utilisée pour normaliser les données. Les valeurs sont des moyennes de triplicates obtenues à partir de 5 expériences distinctes réalisées avec différents donneurs. (B) La même expérience a été réalisée avec les cellules THP1 stimulées par le LPS (10 ng/mL) pendant 4 h. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ par rapport aux cellules non stimulées).

3.2.3 Régulation transcriptionnelle du gène *Hs3st3B1*

Pour étudier la régulation transcriptionnelle du gène *Hs3st3B1*, un fragment génomique de 2140 pb a été cloné en amont du gène de la luciférase dans le vecteur pGL3-basic. Comme attendu, cette séquence de 2140 pb contient la séquence promotrice putative du gène *Hs3st3B1* prédite par le logiciel *Genomatix Model Inspector* (Quandt *et al.*, 1995).

La construction réalisée, nommée pGL3prHs3st3B1, a été transfectée dans les macrophages non différenciés et dans les cellules THP1. La polarisation M1 des macrophages a ensuite été initiée par traitement en présence d'IFN- γ et/ou de LPS. Les monocytes THP1 ont été stimulés par le LPS comme précédemment. Aux temps indiqués, les cellules ont été récupérées et l'activité luciférase a été mesurée. En absence de stimulus, l'activité luciférase est augmentée respectivement d'un facteur 15 et 9 dans les macrophages et dans les cellules THP1 par rapport à l'activité du pGL3-basic dans les mêmes cellules. Comme nous l'attendions, la présence de LPS n'a pas d'effet notable sur l'activité basale du vecteur pGL3-basic vide. En revanche, dans les macrophages transfectés avec le plasmide pGL3prHs3st3B1, l'activité luciférase augmente rapidement pendant les quatre premières heures de stimulation par le LPS ou par le mélange LPS/IFN- γ , puis se stabilise à ce niveau élevé au cours du temps. Par contre, le traitement des macrophages par l'IFN- γ seul n'a pas d'effet notable sur l'activité luciférase (Figure 23A). L'analyse de l'activité luciférase dans les cellules THP1 transfectées avec le plasmide pGL3prHs3st3B1 et stimulées par le LPS montre un profil similaire à celui observé dans les macrophages. En effet, l'activité luciférase augmente rapidement pour atteindre son maximum après 4 h de stimulation par le LPS, puis se stabilise à un taux élevé au cours du temps (Figure 23B). Ces résultats confirment que cette région promotrice putative contient les éléments de réponse au LPS dans les deux types cellulaires. Dans le but de vérifier si le gène rapporteur se comporte comme le gène *Hs3st3B1*, les macrophages et les cellules THP1 transfectés ont été prétraités pendant 1 h avec les inhibiteurs spécifiques de NF-KB, Erk1/2, JNK et p38 MAPK, avant d'être stimulés pendant 6 h en présence du mélange LPS/IFN- γ pour les macrophages et pendant 4 h par le LPS pour les cellules THP1 (Figure 24). Comme précédemment, les différents inhibiteurs ne modifient pas l'activité luciférase en absence de LPS. En revanche, la stimulation des macrophages et des cellules THP1 par les facteurs pro-inflammatoires augmente l'activité luciférase d'un facteur 2 par rapport aux cellules non-stimulées. Cette réponse est considérablement réduite en présence des inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation NF-KB et JNK dans les deux types cellulaires. Dans leur ensemble, les résultats suggèrent un modèle dans lequel les voies de signalisation conduisant à l'activation de NF-KB et de JNK sont directement impliquées dans l'activation rapide de mécanismes transcriptionnels contrôlant l'expression de la 3-OST3B. De façon surprenante, l'inhibition de la voie p38 MAPK n'a pas d'effet sur l'activité luciférase dans les

deux types cellulaires, alors qu'il atténuait l'augmentation d'expression de l'ARNm de la 3-OST3B en réponse au LPS. Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie p38 MAPK serait plutôt requise dans les processus post-transcriptionnels.

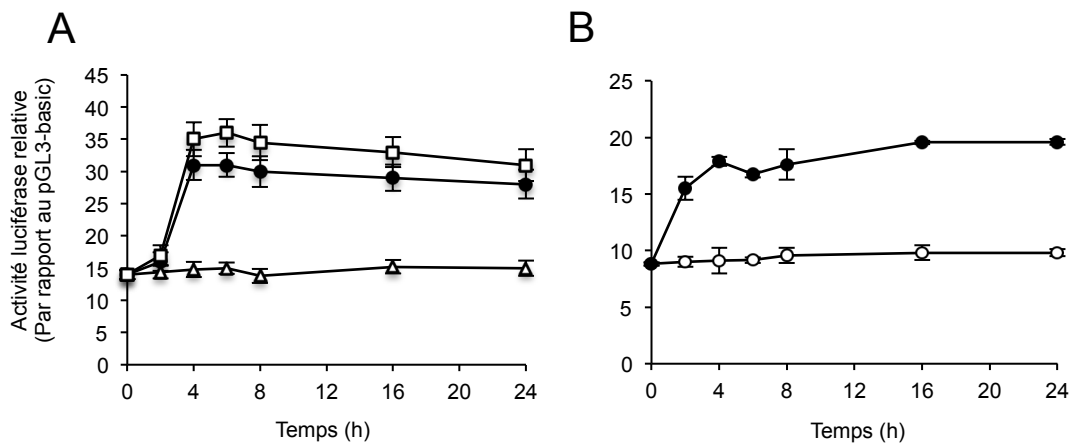


Figure 23: Effets des stimuli pro-inflammatoires sur l'activation du gène *Hs3st3B1* dans les macrophages et monocytes primaires humains. (A) Les macrophages ont été stimulés en présence de LPS (●), d'IFN-γ (△) ou en présence des deux stimuli (□) (10 ng/mL pour chacun). Aux temps indiqués, les cellules ont été collectées et l'activité luciférase a été mesurée. L'activité luciférase mesurée dans les macrophages transfectés avec le plasmide pGL3prHs3st3B1 est normalisée par rapport à celle mesurée dans les cellules transfectées avec le plasmide pGL3-basic vide. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences distinctes réalisées avec différents donneurs. **(B)** La même expérience a été réalisée avec les cellules THP1 stimulées (●) ou non (○) par le LPS (10 ng/mL).

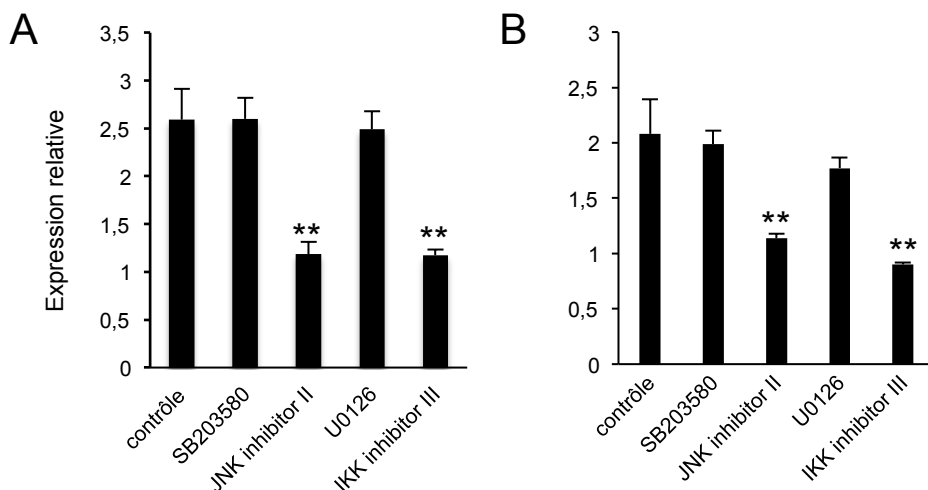


Figure 24: Effets des inhibiteurs spécifiques sur l'activité du promoteur du gène *Hs3st3B1* dans les macrophages et dans les cellules THP1. (A) Après transfection avec le plasmide pGL3prHs3st3B1, les macrophages ont été prétraités ou non pendant 1 h en présence d'inhibiteurs de p38 MAPK (SB203580), JNK (JNK Inhibitor II), Erk1/2 (U0126) et NF-KB (IKK inhibitor III). Les cellules ont été stimulées ou non par l'association LPS/IFN-γ (10 ng/mL), puis collectées pour la mesure de l'activité luciférase. Les données sont normalisées par rapport à l'activité luciférase des cellules non stimulées. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences distinctes réalisées avec différents donneurs. **(B)** La même expérience a été réalisée dans les cellules THP1 en réponse au LPS (10 ng/mL). (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ par rapport aux cellules non stimulées).

3.2.4 Régulation post-transcriptionnelle du gène *Hs3st3B1*

Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle du gène *Hs3st3B1* ont été étudiés uniquement dans les cellules THP1. Dans un premier temps, la stabilité des ARNm codant pour la 3-OST3B a été analysée en réalisant une cinétique d'expression en présence d'actinomycine D dans des cellules prétraitées ou non en présence de LPS pendant 4 h. Les résultats montrent que la demi-vie des transcrits de la 3-OST3B est réduite de 270 min dans les cellules non traitées à 115 min dans les cellules traitées par le LPS. Ces premiers résultats suggèrent que le LPS induit des mécanismes post-transcriptionnels qui vont compléter la transcription afin de maintenir un taux élevé et constant d'ARNm codant pour la 3-OST3B. Comme vu précédemment, la voie p38 MAPK ne participe pas à la régulation transcriptionnelle du gène *Hs3st3B1*. La même expérience a donc été réalisée en présence de l'inhibiteur spécifique de la voie p38 MAPK. Dans ce cas, la demi-vie des transcrits de la 3-OST3B est encore réduite en présence de l'inhibiteur SB203580, puisqu'elle n'est plus que de 80 min, ce qui suggère que la p38 MAPK induit l'activation de mécanismes impliqués dans la stabilisation des transcrits de la 3-OST3B (Sikora *et al.*, 2016).

3.3 Régulation de l'expression de la 3-OST2 au cours de la polarisation M1 des macrophages.

3.3.1 Cinétique d'expression de la 3-OST2 au cours de la polarisation M1

En parallèle des travaux réalisés sur la 3-OST3B, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires à l'origine de la diminution du taux de transcrits de la 3-OST2 au cours de la polarisation M1 des macrophages. Dans un premier temps, nous avons réalisé une cinétique d'expression des transcrits codant pour la 3-OST2. Comme précédemment, les monocytes primaires ont été différenciés *in vitro* par ajout de M-CSF pendant 5 jours. La polarisation M1 des macrophages a ensuite été initiée par traitement en présence d'IFN- γ et/ou de LPS. Aux temps indiqués, les cellules ont été récupérées et l'expression des transcrits a été analysée par RT-qPCR.

Dès 2 h de stimulation par le LPS seul ou par la combinaison IFN- γ /LPS, nos résultats montrent une diminution brutale de l'expression des transcrits de la 3-OST2 d'environ 80 fois par rapport aux macrophages non stimulés. Après 4 h, le niveau d'expression de l'enzyme est quasi indétectable. En revanche, le traitement par l'IFN- γ seul n'a aucun effet sur l'expression de la 3-OST2 (Figure 25). Comme pour la 3-OST3B, ces premiers résultats suggèrent que les variations d'expression de la 3-OST2 observées au cours de la polarisation M1 sont majoritairement dépendantes du LPS.

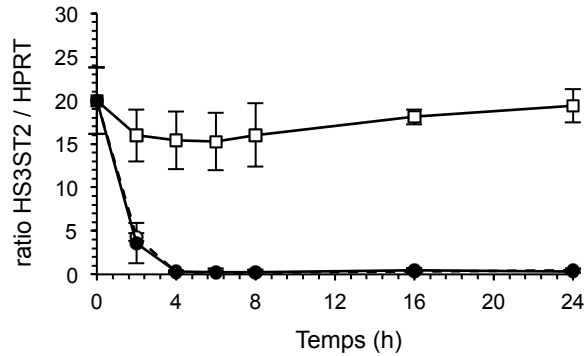


Figure 25: Effets des stimuli de polarisation M1 sur l'expression de l'ARNm codant pour la 3-OST2 dans les macrophages humains. Les macrophages ont été stimulés en présence de LPS (●), d'IFN-γ (□) seuls ou ajoutés simultanément (○) (10 ng/mL pour chacun). Aux temps indiqués, les cellules ont été collectées et l'expression des transcrits de la 3-OST2 a été analysée par RT-qPCR. L'expression du transcrit de l'HPRT a été utilisée pour normaliser les données. Les valeurs sont des moyennes de triplicates obtenues à partir de 5 expériences distinctes réalisées avec différents donneurs.

3.3.2 Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de la 3-OST2

Avant d'identifier les voies de signalisation impliquées dans l'inhibition d'expression de la 3-OST2, les macrophages ont été prétraités comme précédemment avec les inhibiteurs de NF-KB, Erk, JNK et p38 MAPK avant d'être stimulés par la combinaison LPS/IFN-γ, et l'expression des transcrits a été analysée par RT-qPCR. Les résultats montrent que le niveau basal d'expression de la 3-OST2 n'est pas affecté en présence des différents inhibiteurs (Figure 26). Comme attendu, l'association LPS/IFN-γ entraîne une diminution drastique du taux d'ARNm codant pour la 3-OST2. Par contre, le traitement par les différents inhibiteurs n'a aucun effet sur la diminution des transcrits de la 3-OST2, ce qui suggère un mécanisme de régulation différent de celui observé pour la 3-OST3B.

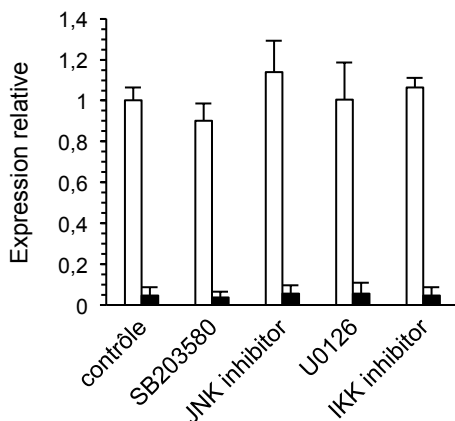


Figure 26: Effets des inhibiteurs des voies de signalisation sur l'expression de la 3-OST2 dans les macrophages. Les macrophages ont été prétraités ou non en présence d'inhibiteurs de p38 MAPK (SB203580), JNK (JNK inhibitor II), Erk1/2 (U0126) et NF-KB (IKK inhibitor III). Puis les cellules ont été stimulées ou non par l'association LPS/IFN-γ (10 ng/mL pour chacun) pendant 6 h. L'expression des transcrits de la 3-OST2 a été analysée par RT-qPCR. L'expression du transcrit de l'HPRT a été utilisée pour normaliser les données. Les valeurs sont des moyennes de triplicates obtenues à partir de 3 expériences distinctes réalisées avec différents donneurs.

3.3.3 Effet des stimuli de polarisation M1 sur la transcription et la stabilité de l'ARNm codant pour la 3-OST2

La diminution brutale de l'expression de la 3-OST2 en réponse à des stimuli de polarisation M1 pourrait être due à des mécanismes post-transcriptionnels, et notamment à un phénomène de déstabilisation de ses ARNm. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé la stabilité des transcrits dans les macrophages traités pendant 2 h soit en présence d'actinomycine D, qui est un puissant inhibiteur de la transcription, soit par l'association LPS/IFN- γ . A différents temps d'incubation, les cellules ont été prélevées et les niveaux de transcrits de la 3-OST2 ont été analysés par RT-qPCR (Figure 27). Les résultats montrent qu'en présence d'actinomycine D, la demi-vie des ARNm de la 3-OST2 est de 107 min dans les macrophages non polarisés. En revanche, la décroissance des transcrits induite par le mélange LPS/IFN- γ est plus rapide que celle induite par l'actinomycine D, avec un $t_{1/2}$ de 48 min. Ces résultats indiquent que l'activation des macrophages par les facteurs de polarisation M1 induit un mécanisme d'élimination des ARNm de la 3-OST2 plus efficace que le seul arrêt de la transcription. En plus d'agir sur la transcription du gène *Hs3st2*, l'association LPS/IFN- γ pourrait contrôler des mécanismes post-transcriptionnels et augmenter le *turn-over* des ARNm codant pour la 3-OST2.

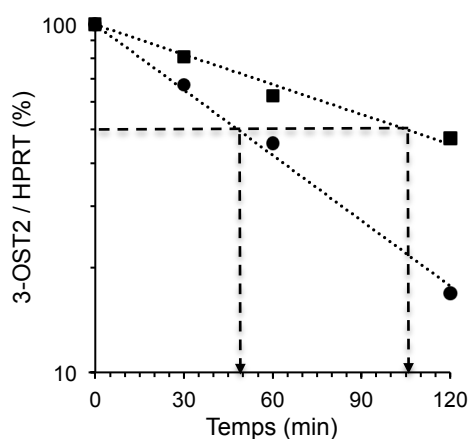


Figure 27: Analyse de la stabilité des transcrits de la 3-OST2 dans les macrophages stimulés ou non par l'association LPS/IFN- γ . Les macrophages ont été stimulés en présence d'actinomycine D (■) (1 μ g/mL) ou en présence du mélange LPS/IFN- γ (●) (10 ng/mL pour chacun). Aux temps indiqués, les cellules ont été collectées et l'expression des transcrits de la 3-OST2 a été analysée par RT-qPCR. L'expression du transcrite de l'HPRT a été utilisée pour normaliser les données. Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport aux taux de transcrits mesurés à t_0 pour les deux conditions. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences distinctes réalisées avec différents donneurs.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tout d'abord mesuré le temps de vie des ARNm non matures (ARNhn) de la 3-OST2. Pour cette analyse, des amorces spécifiques ont été sélectionnées de façon à ce que l'amorce sens se fixe sur l'intron 1-2 et l'amorce

anti-sens en bordure de l'exon 2 du gène *Hs3st2* (sens 5'-TGGAAGGGCTG ATGTAGCTGGGCCTG AGG-3'; anti-sens 5'-GGGACATGTTGAAGATGCGTCGAGGA GCC-3'). Comme précédemment, les macrophages non activés ont été traités pendant 2 h en présence d'actinomycine D ou du mélange LPS/IFN- γ . Les niveaux d'expression des ARNhn de la 3-OST2 ont alors été mesurés par RT-qPCR à différents temps de cinétique (Figure 28). Les résultats montrent que les ARNhn de la 3-OST2 disparaissent très vite après l'arrêt de la transcription induit par l'actinomycine D. En effet, le temps de demi-vie est estimé à 20 min, et l'inhibition maximale de la transcription est atteinte après une 1 h de traitement. Dans le cas du traitement par l'association LPS/IFN- γ , la demi-vie est d'environ 30 min, avec une inhibition maximale observée après 2 h de stimulation. Ces données montrent que la diminution du taux d'ARNhn induite par les facteurs pro-inflammatoires est légèrement retardée par rapport à celui provoqué par l'actinomycine D, ce qui peut s'expliquer par la mise en place de mécanismes plus complexes pour aboutir à un blocage de la transcription. Toutefois, la différence n'est pas aussi marquée que celle observée avec les ARNm, ce qui implique l'existence d'autres mécanismes de régulation négative.

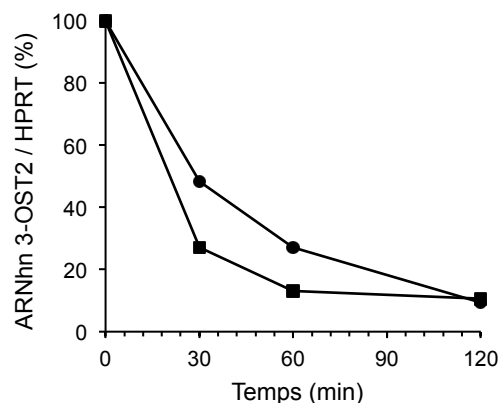


Figure 28: Analyse du temps de vie des ARNm non matures (ARNhn) de la 3-OST2 dans les macrophages stimulés par l'association LPS/IFN- γ . Les macrophages ont été soit traités en présence d'actinomycine D (■) (1 μ g/mL) soit stimulés en présence du mélange LPS/IFN- γ (●) (chacun à 10 ng/mL). Aux temps indiqués, les cellules ont été collectées et l'expression des ARNhn de la 3-OST2 a été analysée par RT-qPCR. L'expression du transcrite de l'HPRT a été utilisée pour normaliser les données. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux taux de transcrits mesurés à T₀ pour les deux conditions. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences distinctes.

Nous avons vu précédemment que les mécanismes conduisant à la disparition des transcrits de la 3-OST2 dans les macrophages M1 sont insensibles aux inhibiteurs des voies de signalisation classiquement activées par les agents pro-inflammatoires. Ces mécanismes ne pouvant pas s'expliquer par un seul arrêt de la transcription, nous nous sommes orientés vers une éventuelle action d'un miRNA. Pour vérifier cette hypothèse, les macrophages non activés ont été traités pendant 4 h avec l'acide aurintricarboxylique (ATA), un composé

pharmacologique utilisé pour bloquer la biogénèse des miRNA et leur activité par inhibition des ribonucléases telles que DICER1 ou celles du complexe RISC (Tan *et al.*, 2012). Puis, les cellules ont été stimulées ou non par le mélange LPS/IFN- γ pendant 4 h (Figure 29). Une légère augmentation de l'expression de la 3-OST2 est observée dans les macrophages non stimulés prétraités par l'ATA par rapport aux cellules non traitées, sans toutefois être significative. Comme attendu, la stimulation en présence de l'association LPS/IFN- γ réduit fortement l'expression de la 3-OST2, avec une diminution de 95 % par rapport aux cellules non stimulées. En revanche, le prétraitement des cellules par l'ATA atténue la diminution du taux de transcrits induite par les stimuli de polarisation M1. En effet, l'expression des ARNm codant pour la 3-OST2 n'est réduite que de 50 % dans les macrophages stimulés et préalablement traités par l'ATA. Ces premiers résultats sont donc en faveur d'un mécanisme dépendant des stimuli de polarisation M1 et conduisant à la maturation et/ou à l'action de miRNA ciblant l'ARNm de la 3-OST2. De plus, le fait que l'action protectrice de l'ATA ne soit pas totale suggère que la déstabilisation des transcrits codant pour la 3-OST2 est complémentaire à celui de l'arrêt de transcription induit par les facteurs inflammatoires.

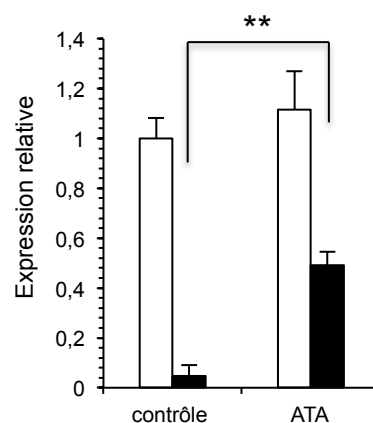


Figure 29: Effet du traitement des macrophages par l'acide aurintricarboxylique (ATA) sur l'expression du transcrit de la 3-OST2 en réponse aux stimuli de polarisation M1. Les macrophages ont été prétraités ou non en présence d'ATA (100 μ M) pendant 4 h, puis stimulés ou non par le mélange LPS/IFN- γ pendant 4 h. Le taux de transcrits de la 3-OST2 a été analysé par RT-qPCR. L'expression du transcrit de l'HPRT a été utilisée pour normaliser les données. Les valeurs sont des moyennes de triplicates et sont représentatives de 3 expériences distinctes réalisées avec différents donneurs (** $p < 0,01$ par rapport aux cellules stimulées par l'association LPS/IFN- γ et en absence de prétraitement par l'ATA).

4. Discussion

Les macrophages sont des acteurs majeurs de nombreux processus physiologiques. Ils interviennent notamment dans les réponses immunitaires innées ainsi que dans la mise en place des réponses adaptatives. Ils participent également à l'homéostasie tissulaire, grâce à leur capacité de phagocytose et à la production de facteurs de remodelage des tissus. Ce large panel de fonctions est permis grâce à la grande plasticité phénotypique de ces cellules, qui sont capables de s'adapter à leur environnement tissulaire et d'exprimer en conséquence diverses molécules nécessaires à leurs activités. Ces modifications phénotypiques sont accompagnées d'une réorganisation au niveau transcriptionnel et épigénétique, ce qui entraîne une régulation différentielle de nombreux métabolismes associées aux fonctions des macrophages (Martinez *et al.*, 2006 ; Biswas *et al.*, 2012).

Les HS sont sulfatés sur différentes positions par plusieurs familles de sulfotransférases, dont l'expression varie en fonction du type cellulaire et du contexte tissulaire. Ainsi, en fonction des sulfotransférases exprimées, les HS 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 HS n'avait jamais été étudié. Etant donné l'importance de ces polysaccharides dans de nombreux processus physiopathologiques, et notamment lors de phénomènes inflammatoires, l'Equipe s'est intéressée aux changements subis par les HS lors de la polarisation des macrophages. Pour cette étude, les monocytes primaires isolés de sang de sujet sains ont été différenciés *in vitro* par ajout de M-CSF. Comme mentionné précédemment, la 3-OST2 est très largement exprimée dans les macrophages non activés. Par contre, les autres 3-OSTs de type gD sont soit exprimées à un taux très faible (3-OST3A, 3B et 6), soit non détectable (3-OST4). La polarisation des macrophages a ensuite été réalisée par traitement en présence d'IFN- γ et de LPS pour l'activation classique (M1) et en présence d'IL-4 et d'IL-13 pour l'activation alternative (M2). Parmi les différentes sulfotransférases dont l'expression est modifiée en réponse à ces facteurs, l'effet le plus marquant a été observé pour les 3-OST2 et 3-OST3B (Martinez *et al.*, 2015). L'expression de la 3-OST3B est fortement induite dans les macrophages M1, alors que les ARNm codant pour la 3-OST2 sont retrouvés à un taux très faible. A l'inverse, la polarisation M2 ne réduit le niveau d'expression d'aucune enzyme, mais induit une augmentation de l'expression des transcrits de la 3-OST2. Des expériences de Western-blot ont confirmé que les variations observées au niveau des transcrits sont corrélées à une expression différentielle des deux protéines correspondantes. Ainsi, ces résultats suggèrent un mécanisme de régulation différent pour les deux isoenzymes au cours de la polarisation des macrophages. Etant donné que les variations d'expression les plus marquées ont été observées lors du passage

d'un état non activé à un phénotype M1, nous nous sommes focalisés sur les mécanismes à l'origine des variations d'expression de la 3-OST2 et 3-OST3B au cours de l'activation pro-inflammatoire des macrophages.

Dans ce contexte, nous avons tout d'abord réalisé une étude cinétique des variations d'expression des transcrits des 3-OST2 et 3B en réponse à une stimulation par le LPS ou l'IFN- γ , seuls ou ajoutés simultanément. Les résultats obtenus pour la 3-OST2 montrent une diminution brutale du taux de transcrits dès 2 h de stimulation par le LPS ou par la combinaison LPS/IFN- γ . En revanche, le traitement par l'IFN- γ seul n'a aucun effet sur l'expression de la 3-OST2. Contrairement à cette dernière, la 3-OST3B est fortement induite en réponse au LPS seul ou associée à l'IFN- γ , avec un maximum observé après 4 h de stimulation. Par contre, le traitement par l'IFN- γ seul n'a aucun effet sur l'expression de la 3-OST3B. Ces premiers résultats indiquent que les variations d'expression de la 3-OST2 et de la 3-OST3B observées au cours de la polarisation M1 sont dépendantes des voies activées par la fixation du LPS sur les macrophages. Les travaux réalisés en parallèle sur l'activation des monocytes par le LPS ont montré les mêmes résultats. En effet, le facteur pro-inflammatoire induit également une forte augmentation de l'expression de la 3-OST3B, alors que l'IFN- γ seul n'a pas d'effet (Sikora *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que l'expression de la 3-OST3B puisse être régulée par les mêmes mécanismes dans les deux types cellulaires.

Afin de décrypter les mécanismes moléculaires à l'origine de l'augmentation de l'expression de la 3-OST3B dans les macrophages activés, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques des principales cascades de signalisation activées par le LPS. Nos résultats montrent l'importance des voies NF-KB, JNK et p38 MAPK dans l'activation rapide de l'expression de la 3-OST3B. Les mêmes expériences réalisées avec les monocytes ont donné des résultats identiques, suggérant que la surexpression de la 3-OST3B implique des mécanismes similaires dans les deux types cellulaires.

Pour étudier la régulation transcriptionnelle du gène *Hs3st3B1*, la séquence promotrice putative du gène a été clonée en amont du gène de la luciférase. Le gène rapporteur a ensuite été transfecté dans les macrophages et les monocytes. Dans les deux types cellulaires, le LPS seul ou l'association LPS/IFN- γ induisent une augmentation de l'activité luciférase, avec un profil similaire à celui observé pour les ARNm de la 3-OST3B. Nous avons ensuite montré que l'activation du gène rapporteur est inhibée dans les cellules prétraitées par les inhibiteurs de NF-KB et JNK. D'après ces résultats, la transcription du gène *Hs3st3B1* serait bien sous le contrôle des voies conduisant à l'activation de ces deux molécules de signalisation. Ce modèle est en accord avec nos analyses *in silico* du promoteur putatif du gène *Hs3st3B1* (Figure 30). En effet, trois éléments de réponse au NF-

KB ont été identifiés, ce qui peut expliquer la forte inhibition obtenue avec le composé ciblant ce facteur de transcription. De plus, la séquence putative contient des éléments de réponse pour le facteur de transcription AP-1, décrit pour être activé par la voie JNK en réponse à des stimuli pro-inflammatoires (Diaz and Lopez Berestein, 2000). Des expériences complémentaires par mutagénèse dirigée du promoteur putatif cloné permettront de confirmer l'identité des éléments *cis*-régulateurs impliqués dans la fixation des facteurs de transcription au niveau de la séquence promotrice du gène *Hs3st3B1*.

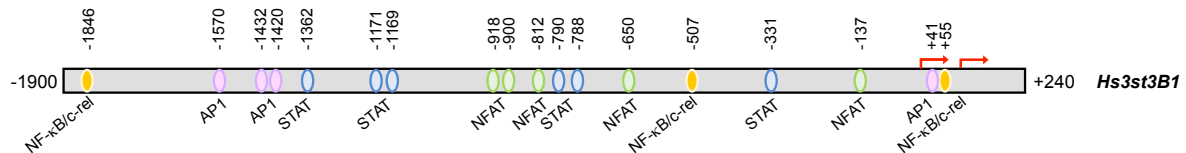


Figure 30: Schéma illustrant l'organisation du promoteur putatif du gène *Hs3st3B1*. Les chiffres indiquent la position relative des éléments *cis*-régulateurs détectés par le logiciel Genomatix (*GmbH*) par rapport au TSS (+1), indiqué par les flèches.

De façon surprenante, l'inhibition pharmacologique de la voie p38 MAPK n'a pas d'effet notable sur l'activité luciférase du gène rapporteur dans les deux types cellulaires, alors que le taux de transcrits de la 3-OST3B est réduit de manière significative par le même inhibiteur. Ces résultats suggèrent que la voie p38 MAPK serait plutôt impliquée dans des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. En effet, plusieurs études ont reporté un rôle de p38 MAPK dans la stabilisation des ARNm de certains médiateurs inflammatoires, tels que le TNF- α et la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) par inhibition de la fixation des protéines TTP au niveau du 3'UTR des transcrits (Neininger *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2011; Palanisamy *et al.*, 2012). Par conséquent, l'absence du 3'UTR de l'ARNm de la 3-OST3B dans le gène rapporteur pourrait expliquer l'inefficacité de l'inhibiteur. Nous avons donc réalisé une analyse de la demi-vie des ARNm codant pour la 3-OST3B dans les monocytes stimulés par le LPS. Les résultats montrent que l'inhibition de la voie p38 MAPK s'accompagne d'une réduction de la demi-vie des ARNm, ce qui est en accord avec le taux réduit de transcrits dans les cellules traitées par le même inhibiteur. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la voie p38 MAPK serait nécessaire à la mise en place de mécanismes post-transcriptionnels impliqués dans la stabilité des transcrits de la 3-OST3B.

Contrairement à ce qui est observé pour la 3-OST3B, la stimulation des macrophages par le LPS seul ou associé à l'IFN- γ inhibe l'expression de la 3-OST2. Les mécanismes impliqués semblent être différents, puisque les inhibiteurs pharmacologiques précédemment utilisés n'ont aucun effet sur la diminution des transcrits. Par conséquent, la régulation de la 3-OST2 en réponse à des stimuli de polarisation M1 ferait intervenir des mécanismes plus complexes, ne dépendant pas des voies de signalisation classiquement activées par les stimuli pro-inflammatoires.

Afin de vérifier si la chute brutale de l'expression de la 3-OST2 est consécutive à un arrêt de la transcription, nous avons réalisé une étude cinétique de l'expression des ARNhn dans les macrophages stimulés en présence de l'association LPS/IFN- γ ou traités par l'actinomycine D. Nos résultats montrent que les stimuli pro-M1 induisent une diminution rapide du taux des ARNhn dans les macrophages, ce qui suggère un arrêt de la transcription du gène *Hs3st2*. Nous avons donc recherché des sites potentiels *cis*-régulateurs potentiellement impliqués dans la fixation de facteurs répresseurs. L'analyse *in silico* du promoteur putatif du gène *Hs3st2* a révélé l'existence d'éléments de réponse pour NF-KB et AP-1 (Figure 31). Toutefois, l'inhibition des voies de signalisation conduisant à l'activation de ces facteurs de transcription n'a pas d'effet notable sur la réponse induite par l'association LPS/IFN- γ , ce qui exclut leur implication dans les mécanismes de régulation de l'expression de la 3-OST2. Par contre, nous avons noté la présence d'un élément de réponse pour le facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Cette observation est intéressante, car le LPS induit la translocation de ce facteur de transcription dans le noyau, et il a été récemment démontré qu'il inhibe la fixation de l'ARN polymérase II au niveau des séquences promotrice de plusieurs gènes au cours de la polarisation M1 des macrophages (Tsai *et al.*, 2006 ; Kobayashi *et al.*, 2016). Les relations entre l'activation du facteur de transcription Nrf2 par le LPS et l'inhibition de la transcription de la 3-OST2 dans les macrophages M1 restent encore à déterminer.

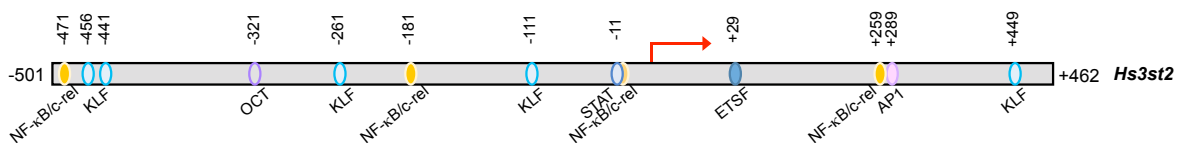


Figure 31: Schéma illustrant l'organisation du promoteur putatif du gène *Hs3st2*. Les chiffres indiquent la position relative des éléments *cis*-régulateurs détectés par le logiciel Genomatix (*GmbH*) par rapport au TSS (+1), indiqué par les flèches.

Nous avons poursuivi cette étude en analysant les temps de demi-vie des ARNm codant pour la 3-OST2 dans les macrophages stimulés ou non en présence du mélange LPS/IFN- γ . Nos résultats montrent que la stimulation par les facteurs pro-M1 s'accompagne d'une réduction de la demi-vie des ARNm. En outre, nous avons vérifié qu'un inhibiteur pharmacologique des miRNA atténue l'effet négatif des stimuli de polarisation M1 sur l'expression de la 3-OST2. Ces résultats préliminaires suggèrent que la forte diminution du taux de transcrits de la 3-OST2 pourrait être en partie liée à la mise en place de mécanismes post-transcriptionnels faisant notamment intervenir des miRNA.

Contrairement à la 3-OST3B, la région 3'UTR des ARNm de la 3-OST2 ne contient pas de sites ARE (*AU-rich elements*), décrits comme étant impliqués dans la fixation de facteurs de régulation de la stabilité des ARNm (Barreau *et al.*, 2006). En revanche, il est

maintenant bien établi que la polarisation des macrophages est finement contrôlée par l'action de nombreux miRNA (Liu and Abraham, 2013). Des analyses *in silico* à partir des bases de données miRanda, mirWalk et Target Scan nous ont permis de vérifier l'existence de nombreux sites potentiels de fixation de miRNA dans la séquence de l'ARNm codant pour la 3-OST2. Deux d'entre eux ont plus particulièrement attiré notre attention : les miR-99a et miR-100. Le premier a été décrit pour inhiber l'expression de la 3-OST2 au niveau neuronal. En outre, son activité est augmentée en réponse au LPS, ce qui suggère qu'il pourrait être actif dans les macrophages M1 et agir sur l'expression de la 3-OST2 (Christensen *et al.*, 2010 ; Tserel *et al.*, 2011). Le second a également été décrit pour inhiber l'expression de la 3-OST2, mais dans les cellules de cancer colique (Yang *et al.*, 2015). Ces deux miRNA ciblent la région 3'UTR de l'ARNm codant pour la 3-OST2. Dans ce contexte, nous avons tout d'abord confirmé que les deux miRNA d'intérêt sont bien exprimés dans les macrophages M1. En parallèle, nous avons cloné la région 3'UTR de l'ARNm codant pour la 3-OST2 en aval du gène de la luciférase. Après transfection de ce gène rapporteur dans les macrophages, nous avons observé une diminution de l'activité luciférase en réponse à une stimulation par le mélange LPS/IFN- γ . Ces résultats préliminaires étant en faveur d'un rôle des miR-99a et miR-100 dans la régulation de l'expression de la 3-OST2. Nous avons muté les sites potentiels de fixation des deux miRNA dans le vecteur rapporteur. L'analyse des vecteurs mutés est en cours de réalisation, ce qui devrait nous permettre de confirmer le rôle de ces deux miRNA dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la 3-OST2.

Dans leur ensemble, nos résultats montrent que les profonds changements dans l'expression des 3-OST2 et 3-OST3B lors de la polarisation M1 des macrophages sont consécutifs à la mise en place de mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels spécifiques à chaque isoenzyme. Ainsi, l'expression différentielle des deux 3OSTs pourrait être à l'origine de la synthèse de motifs HS 3-O-sulfatés distincts, potentiellement impliqués dans les fonctions spécifiques aux sous-types de macrophages.

Partie 3 : Etude de la localisation subcellulaire des 3-OSTs

1. Introduction

La biosynthèse des chaînes HS est un processus complexe et finement régulé, au cours duquel glycosyl-transférases, épimérase et sulfotransférases interviennent de façon séquentielle et coordonnée. A l'exception de la 3-OST1, toutes ces enzymes sont des protéines transmembranaires de type II. Le concept de « GAGosome » a été introduit pour la première fois par Esko and Selleck. (2002) pour définir un complexe macromoléculaire formé par l'association des différentes enzymes de biosynthèse des HS. Les fonctions associées à ce complexe seraient régulées par la capacité des enzymes à s'associer entre elles, par leur stœchiométrie au sein du complexe et par l'existence de différentes isoenzymes, dont l'expression est dépendante du type cellulaire et de son environnement. Ainsi, le profil d'expression des différentes enzymes de biosynthèse serait à l'origine de la formation de différents « GAGosomes », aboutissant à la génération de chaînes HS avec des profils de substitution variés selon le type cellulaire (Figure 32).

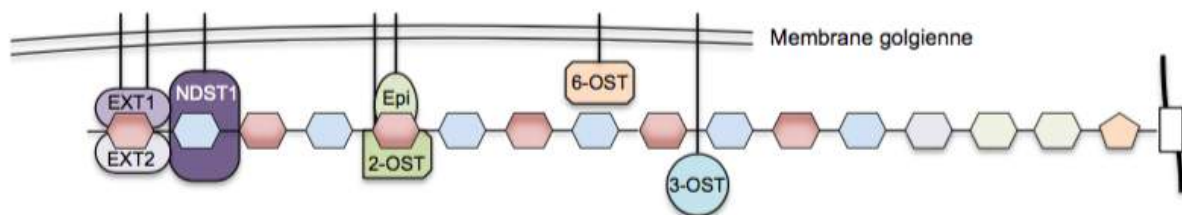


Figure 32: Représentation schématique du GAGosome. D'après Lindhal and Li. (2009).

L'hypothèse de l'existence de différents GAGosomes est en accord avec plusieurs études. Il a ainsi été démontré que la biosynthèse d'une chaîne d'héparine correctement substituée s'effectue en moins d'une minute, ce qui implique l'existence d'un GAGosome capable de synthétiser ce polysaccharide de manière efficace et rapide (Hook *et al.*, 1975; Lidholt *et al.*, 1989). Des travaux plus récents portant sur la localisation subcellulaire des enzymes de biosynthèse ont conforté cette hypothèse. Par exemple, l'utilisation de formes étiquetées de EXT1 et EXT2 a montré une localisation golgienne des deux polymérases. Des expériences d'immunoprécipitation ont ensuite permis la mise en évidence d'une interaction physique entre les deux enzymes (Kobayashi *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2000; Senay *et al.*, 2000). La NDST1, qui est l'enzyme clé d'initiation de la maturation des HS, a été décrite comme une protéine résidente de l'appareil de Golgi. Les travaux de Presto *et al.* (2008) ont démontré qu'elle peut interagir avec EXT2, ce qui aurait pour effet d'augmenter son activité. A l'inverse, son activité est diminuée lorsque EXT2 est complexée

à EXT1. Les travaux de Pinhal *et al.* (2001) ont mis en évidence un autre complexe formé par l'association de la C5-épimérase et de la 2-OST, les deux enzymes agissant sur les acides uroniques au sein de l'appareil de Golgi. Finalement, si aucune interaction avec d'autres enzymes de biosynthèse des HS n'a encore été démontrée pour les 6-OSTs, l'utilisation de formes étiquetées a permis de montrer une localisation golgienne pour les trois isoenzymes. En outre, des expériences de mutagenèse ont montré l'importance du domaine tige de ces sulfotransférases dans leur localisation subcellulaire et leur oligomérisation (Nagai *et al.*, 2004).

2. Travaux de recherche

A ce jour, les différentes études sur la localisation subcellulaire des enzymes de biosynthèse des HS ont confirmé leur présence dans l'appareil de Golgi, compartiment dans lequel elles sont le plus souvent associées en complexes macromoléculaires. Toutefois, aucune étude n'a été reportée sur la localisation subcellulaire des 3-OSTs, et l'éventuelle association de ces enzymes au sein de GAGosomes reste encore inconnue.

Afin de préciser la localisation subcellulaire des 3-OST2, 3A et 3B, nous avons construit des vecteurs d'expression codant soit pour les formes entières des trois enzymes, soit pour des formes tronquées dépourvues de leur domaine catalytique. Par des expériences de microscopie de fluorescence, nous avons démontré que la 3-OST3B est strictement localisée dans l'appareil de Golgi, alors que la 3-OST3A est également retrouvée dans des vésicules intracellulaires à proximité de la membrane plasmique. Dans les deux cas, les formes tronquées montrent la même distribution subcellulaire, ce qui indique que le domaine catalytique n'est pas impliqué dans l'adressage des deux isoenzymes. En revanche, la 3-OST2 est entièrement retrouvée à la membrane cellulaire, alors que sa forme tronquée reste golgienne. Ces observations suggèrent que la 3-OST2 serait adressé hors de l'appareil de Golgi par un mécanisme dépendant de son domaine catalytique. Nous avons alors recherché si la localisation non conventionnelle des 3-OST2 et 3-OST3A pouvait être dû à une éventuelle association avec des partenaires présents dans les mêmes compartiments. Nos travaux montrent une localisation commune avec les syndécan-2 et -4, suggérant que ces deux protéoglycanes puissent être impliqués dans la localisation non-golgienne des deux isoenzymes.

Les résultats sont présentés dans l'article : « **Heparan sulfate 3-O-sulfotransferases 2, 3A and 3B display distinct subcellular localization** ».

3. Publication

Heparan sulfate 3-O-sulfotransferases 2, 3A and 3B display distinct subcellular localization

Maxime Delos, François Foulquier, Dorothée Vicogne, Charles Hellec, Mathieu Carpentier, Fabrice Allain and Agnès Denys¹

University of Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France

¹*Correspondence: Agnès Denys, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; Tel: +33-3-20-33-72-39; Fax: +33-3-20-43-65-55; e-mail: agnes.denys@univ-lille1.fr*

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; GFP, green fluorescent protein; GlcN, glucosamine; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GlcUA, glucuronic acid; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; HS, heparan sulfate; HS3ST, HS 3-O-sulfotransferase; HS6ST, HS 6-O-sulfotransferase; IdoUA, L-iduronic acid; NDST, N-deacetylase/N-sulfotransferase; PBS, phosphate buffer saline; RFP, red fluorescent protein; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; siRNA, small-interfering RNA ; WT, wild-type

Introduction

Heparan sulfate (HS) are linear polysaccharides composed of repeating disaccharide units of sulfated uronic acid and glucosamine (GlcN) residues. They are covalently attached to core proteins, thus assembling to proteoglycans. A number of signaling events that occur at the cell membrane during developmental, regenerative and inflammatory processes require the assistance of cell surface HS moieties of proteoglycans. They are indeed involved in the engagement of many ligands with their cognate receptors, explaining why HS proteoglycans are usually considered as co-receptors (Esko and Selleck, 2002; Sarrazin *et al.*, 2011; Mortier *et al.*, 2012). Syndecans, which are represented by four members, are the major source of cell surface HS. The protein core of these proteoglycans consists of a highly conserved C-terminal cytoplasmic domain, a short transmembrane domain and a large N-terminal extracellular domain. The cytoplasmic domain contains conserved motifs, through which syndecans interact with regulatory proteins involved in signaling and organizing complexes at the plasma membrane. Thereby, syndecans are of key importance in cell adhesion, growth and differentiation. With the exception of the HS attachment sites, the ectodomain is highly variable between the four syndecans, which suggests that it could interact with distinct partners at the cell membrane and in the extracellular matrix (Morgan *et al.*, 2007, Lambaerts *et al.*, 2009; Couchman, 2010).

As it transits in the Golgi apparatus, the linear HS precursor composed of alternating glucuronic acid (GlcUA) and *N*-acetyl glucosamine (GlcNAc) is extended *via* EXT1/EXT2 copolymerases, and then sequentially modified through the action of *N*-deacetylases/*N*-sulfotransferases (NDSTs), C5-epimerase, and HS 2-, 6-, and 3-*O*-sulfotransferases (HS2ST, HS6ST, HS3ST). These enzymatic modifications are not systematic, which leads to the occurrence of domains of relatively high IdoUA content and sulfate density (NS domains), bound by short transition zones with intermediate sulfation patterns and separated by *N*-acetylated domains (NA domains). Importantly, NDSTs, HS6STs and HS3STs are represented by distinct isoenzymes, which are differently expressed depending on cell type and tissue environment. As example, human HS3STs are represented by seven isoenzymes, namely HS3ST1, HS3ST2, HS3ST3A, HS3ST3B, HS3ST4, HS3ST5 and HS3ST6, which possess more than 60 % of sequence homology in their sulfotransferase domain. Nevertheless, the reaction of 3-*O*-sulfation is the least abundant modification in HS, and to date, very few biological mechanisms have been reported to depend on 3-*O*-sulfated HS (Thacker *et al.*, 2014). HS3ST1 was reported to generate the HS binding site for antithrombin-III. In contrast, HS3ST2, 3A, 3B, 4 and 6 transfer sulfate groups to the 3-OH position of GlcNS or GlcNH₂ adjacent to an IdoUA2S residue. Thus, they provide HS-binding sites for the glycoprotein D (gD) of herpes simplex virus-1 (HSV-1). In contrast, HS3ST5

exhibits broad substrate specificity and generates HS-binding motifs for both ligands (Shukla *et al.*, 1999 ; Xia *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2005 ; O'Donnell *et al.*, 2006 ; Tiwari *et al.*, 2007).

In the current scheme of HS biosynthesis, all the enzymes are considered to be resident of the Golgi apparatus. In this way, a number of previous studies have postulated that the majority of HS-modifying enzymes may be gathered in a GAGosome, in which they work in close proximity of each other (Esko and Selleck, 2002). As example, EXT1 and EXT2 form a hetero-oligomeric complex in the Golgi apparatus. This complex is likely to represent the biologically relevant form of the enzymes *in vivo*, as it exhibits enhanced glycosyltransferase activity compared to EXT1 or EXT2 alone (Kobayashi *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2000). By overexpressing EXT1 and/or EXT2 in HEK-293 cells, Presto *et al.* (2008) demonstrated that the expression and activity of NDST1 were affected with an opposite effect depending on EXT1 and EXT2. Immunoprecipitation experiments highlighted an interaction between EXT2 and NDST1, which suggested that NDST1 might compete with EXT1 for binding to EXT2. Physical association between C5-epimerase and HS2ST has also been reported. This interaction affects the localization and activity of C5-epimerase and may play a functional role in chain modification by ensuring rapid and complete 2-O-sulfation of nascent IdoUA residues (Pinhal *et al.*, 2001). The subcellular localization of HS6STs was investigated by using green fluorescent protein (GFP)-tagged forms of the enzymes. This experimental approach showed that the three HS6STs are retained into the Golgi apparatus, *via* a mechanism dependent on their stem domain for correct addressing (Nagai *et al.*, 2004). With the exception of HS3ST1, HS3ST isoenzymes are type II transmembrane proteins with cytosolic, transmembrane and stem domains. However, the subcellular localization of HS3STs has not been yet specified, even though these enzymes represent the largest family among HS sulfotransferases.

In previous works, we demonstrated that HS3ST2, HS3ST3A and HS3ST3B are differently expressed in monocytes/macrophages depending on the inflammatory environment. HS3ST3B was strongly induced in LPS-activated monocytes and M1 macrophages, indicating that the expression of this isoenzyme is upregulated by pro-inflammatory stimuli. In contrast, HS3ST2 was highly expressed in M2 macrophages, while it was not detected in M1 macrophages and monocytes. We also found that exposure of monocytes/macrophages to pro- or anti-inflammatory stimuli had no notable effect on the expression of HS3ST3A (Martinez *et al.*, 2015; Sikora *et al.*, 2016). These enzymes were reported to catalyze the same reaction of 3-O-sulfation *in vitro* and to provide the HS binding sites for the glycoprotein gD of HSV-1 (Shukla *et al.*, 1999; O'Donnell *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2007; Thacker *et al.*, 2014). However, their differential expression in monocytes/macrophages suggests that they may be involved in the synthesis of 3-O-sulfated HS with distinct structural features and functions.

In the assumption that distinct localization may affect the activity of these enzymes, we examined here the subcellular distribution of fluorescently labeled HS3ST2, HS3ST3A and HS3ST3B. To this end, HeLa cells were transfected with expression vectors encoding red fluorescent protein (RFP)-tagged constructs fused to either wild-type enzymes (WT forms) or mutated forms that have deleted from their catalytic domain (Δ cat forms). While HS3ST3B constructs appeared to be strictly confined to the Golgi apparatus, HS3ST3A forms were distributed between Golgi and small vesicles close to the plasma membrane. Most surprisingly, we found the both forms of HS3ST2 did not share the same subcellular localization. The truncated form was indeed retained in the Golgi apparatus, while the WT enzyme was clearly visualized at the plasma membrane. This suggests that the catalytic domain of HS3ST2 was capable of addressing the enzyme outside the Golgi apparatus. We also found that HS3ST2 and HS3ST3A partially co-localized with syndecan-2 and syndecan-4, respectively. Silencing the expression of these proteoglycans altered the membrane localization of HS3ST2 and HS3ST3A, which suggests that syndecan-2 and syndecan-4 are required to address each isoenzyme outside the Golgi apparatus. Finally, we found that endogenous HS3ST2 co-localized with syndecan-2 at the cell membrane of macrophages, which confirms the specific interaction between both molecules. Collectively, our results suggest that HS3ST3B is probably fully involved in the reaction of 3-O-sulfation in the Golgi apparatus, while HS3ST3A and HS3ST2 may also participate, at least in part, in other processes that occur at the plasma membrane.

Materials and methods

Materials

Rabbit antibody to HS3ST2 was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), as were secondary antibodies conjugated to Alexa-488 and Alexa-568. Mouse antibodies to HS3ST3A (clone E-12), syndecan-1 (clone DL-101), syndecan-2 (clone H-7) and syndecan-4 (clone 5G9) were purchased from Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-GM130 and anti-calnexin antibodies were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Secondary antibodies conjugated to horse radish peroxidase (HRP) were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Other chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise specified.

Isolation of human monocyte-derived macrophages and cell culture

Human citrated venous blood samples were obtained from the local blood transfusion center (Lille, France). Following isolation of peripheral blood mononuclear cells by density

centrifugation on Lymphoprep (Eurobio-AbCys, Courtaboeuf, France), monocytes were purified with magnetic beads coupled to CD14, according to the instructions of the manufacturer (BD Biosciences). Purity of the cell population was assessed by flow cytometry and found >95 %. Macrophages were then obtained by incubating freshly isolated monocytes (1×10^6 cells/mL) for 5 days in RPMI 1640 medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10 % (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 10 ng/ml M-CSF (Peprotech, Rocky Hill City, NJ, USA). The experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject (EFS, NT/18/2015/092). The study methodologies conformed to the standards set by the Declaration of Helsinki and were approved by the local ethics committee (French research ministry, DC-2008-242).

HeLa cells was routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 4.5 g/L glucose, Ultraglutamine-1 and 10 % FCS (Lonza), at 37°C in an atmosphere containing 5 % CO₂.

RNA isolation and real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from 1×10^6 cells using the NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Reverse transcription was performed from 1 µg of total RNA by using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific). Synthetic primers for syndecan-1, -2, -3 and -4 were designed by using Primer-Blast (NCBI) according to published sequences: syndecan-1 (NM_002997.4), 5'-GGGACTCAGCCTTCAGACAG-3' (forward) and 5'-CTCGTCAATTTCCAGGAGGA-3' (reverse); syndecan-2 (NM_002998.3), 5'-CTGCTCCAAAAGTGGAAACC-3' (forward) and 5'-TGGGTCCATTTTCCTTTCTG-3' (reverse); syndecan-3 (NM_014654.3), 5'-ACCCCAACTCCAGAGACCTT-3' (forward) and 5'-CCCACAGCTACCACCTCATT-3' (reverse) and syndecan-4 (NM_002999.3), 5'-CATTAGCTCCCGTCACCACT-3' (forward) and 5'-AGAGGAGGTGCTCACTCCAA-3' (reverse) (Eurogentec, Seraing, Belgium). Specificity of the primers was checked by semi-quantitative RT-PCR on a 2.5 % (w/v) agarose gel. All of them amplified only one fragment of expected size, for which the sequence was confirmed (GATC Biotech, Constance, Germany). Real-time PCR amplifications were performed using an Mx3000P Multiplex Quantitative PCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The transcript of HPRT was used as a control to normalize the expression of our genes of interest. Each reaction of PCR consisted of 25 µL containing 2 µL of diluted cDNA sample (1:4), 12.5 µL of Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 µL of forward primer (15 µM), 1 µL of reverse primer (15 µM) and 8.5 µL of water. Each PCR 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°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at specific temperature of annealing (60°C for all primer pairs) and 30 s at 72°C. The fluorescence data were measured at the end of each cycle. A melting curve (55-95°C at 1°C interval) was constructed for each primer pair to check for the presence of one gene-specific peak. The amplification efficiency of each primer pair was performed on serial dilutions of cDNA. Triplicate PCR reactions were prepared for each sample. The point at which the PCR product was 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).

Construction of expression plasmids

The encoding regions of human *HS3ST2* (NM_006043) and *HS3ST3A* (NM_006042) were isolated from cDNA of primary macrophages, while the encoding region for *HS3ST3B* (NM_006041) was obtained from the fibroblast MRC-5 SV2 cell line (Martinez *et al.*, 2015; Sikora *et al.*, 2016). For each isoform, 4 recombinant forms were constructed. Full-length cDNAs (WT) were inserted into pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific) upstream a sequence coding for monomeric red fluorescent protein 1 (mRFP1) or green fluorescent protein (GFP). Truncated forms (Δ cat) encoding the cytoplasmic, transmembrane and stem regions were fused to the NH₂ terminus of both fluorescent proteins. All cDNA were amplified by PCR with specific forward and reverse primers (Table 1) and the DynaZyme EXT DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), as described in the manufacturer's protocol. PCR fragments were generated with *NheI* or *XhoI* restriction sites at the 5' end and *HindIII* or *BamHI* at the 3' end. After digestion with the appropriate restriction enzymes, fragments were inserted in-frame with mRFP1 or GFP to express tagged proteins or into empty pcDNA3.1 to express untagged proteins. The predicted protein structures encoded by the plasmids are shown in Figure 1A.

Cell transfection of expression plasmids and siRNA

For cell transfection of expression plasmids, HeLa cells were plated at 2×10^5 cells per well and transiently transfected with ADN-lipofectamine 2000 complexes at a ratio 1:4, according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). For siRNA-mediated silencing experiments, HeLa cells and macrophages were plated at 2×10^5 cells per well and 1×10^6 cells per well, respectively. Thereafter, cells were transfected with siRNA (60 pmoles

per well) using INTERFERin (Polyplus, Illkirch, France), according to the manufacturer's recommendations. Synthetic siRNA duplex targeting syndecan-4 mRNA was described in Baietti *et al.* (2012). A synthetic siRNA duplex corresponding to the sequence of syndecan-2 mRNA 5'-AAAACUCCAACUUAGUGUCdTdT-3' was designed by Sigma-Aldrich. All siRNA were synthesized by Sigma-Aldrich and tested for their efficiency to silence the expression of mRNA target. A control siRNA duplex (MISSION®, Sigma-Aldrich) was used as negative control.

Western Immunoblotting

HeLa cells (1×10^6 /point) were lysed in 40 μ L lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH 8.0), supplemented with 1 mM NaVO_3 , 10 mM NaF and protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics, Meylan, France) for 3 h at 4°C. Lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4°C. Protein content of the supernatants was estimated using micro BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific). Volumes of lysates corresponding to twenty micrograms of proteins were mixed with Laemmli buffer and boiled for 10 min. Proteins were then separated by SDS-PAGE (10 %, w/v) and transferred onto nitrocellulose membrane (Amersham, Uppsala, Sweden). The membrane was blocked for 1 h at room temperature in 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl buffer (TBS) supplemented with 0.05 % (v/v) Tween-20 and 5 % (w/v) nonfat dry milk powder, and then probed overnight with primary antibodies (1:1000) in TBS supplemented with 5 % (w/v) nonfat dry milk powder. After washing, immunoreactive proteins were visualized with HRP-conjugated secondary antibodies (1:10 000) and ECL detection kit (Amersham).

Immunofluorescence staining

Cells were seeded on glass coverslips and transfected with siRNA for 48 h and/or with expression plasmid for 24 h. They were then washed once with 0.1 M sodium phosphate buffer (PBS, pH 7.2) and fixed in 4 % paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature. After three washing with PBS, cells were permeabilized with 0.5 % Triton X-100 in PBS for 5 min, and then incubated for at least 60 min with a blocking solution containing 0.1 % Triton X-100, 1 % BSA (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) and 5 % normal goat serum (Thermo Fisher Scientific) in PBS. Following blocking, cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted (1:1000) in the blocking buffer. After washing, they were incubated for 1 h with Alexa 488- or Alexa 568-conjugated secondary antibodies diluted at 1:600 in blocking buffer. Finally, cells were stained with 500 ng/mL DAPI (Sigma-Aldrich) for 10 min, in order to visualize cell nuclei. Immunostaining was detected

with an inverted Zeiss LSM 780 microscope (Oberkochen, Germany) equipped with a 63x oil immersion lens, at room temperature. Data were collected using the Zeiss Zen Pro 2.1 software and processed with Image J software.

Statistical analysis

Results are representative of at least three independent experiments. Statistical significance between the different values was analyzed by Student's *t*-test, with a threshold of $P < 0.05$ considered as significant.

Results

Subcellular localization of fluorescently tagged HS3ST2, HS3ST3A and HS3ST3B

The subcellular localization of human HS3ST2, HS3ST3A and HS3ST3B was investigated by using overexpression systems in HeLa cells. We used this model because of the absence of HS3ST2 and the low expression of endogenous HS3ST3A and HS3ST3B in these cells (Deligny *et al.*, 2010). The expression vectors for RFP-tagged proteins were constructed with either the full-length sequences encoding each enzyme (HS3STs-WT-RFP) or truncated sequences deleted of the catalytic domains (HS3STs- Δ cat-RFP). The predicted structure of the different constructs was schematically represented in Figure 1.

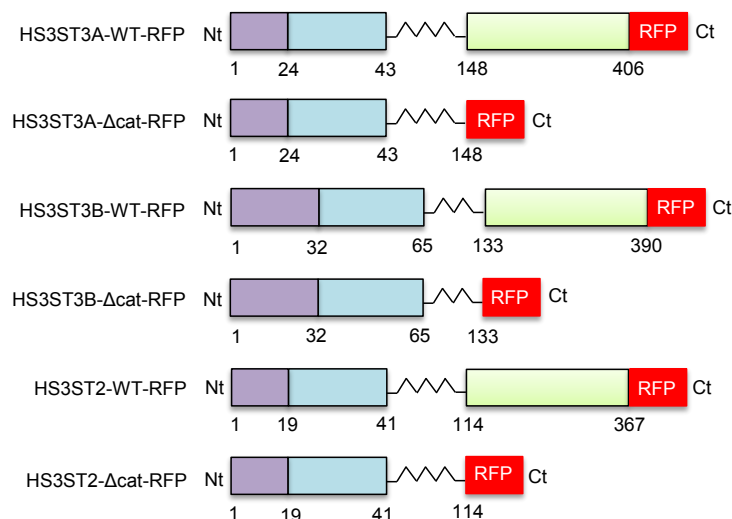


Figure 1. Schematic representation of RFP-tagged full length (WT) and truncated (Δ cat) forms of HS3ST3A, HS3ST3B and HS3ST2. The purple, blue, green and red boxes indicate the intracellular and transmembrane regions, the sulfotransferase domain and the RFP tag, respectively. The zigzag line illustrates the stem domain. The numbers indicate position of each domain in amino acid sequences.

HeLa cells were then transiently transfected with the different expression vectors and the expression of RFP-tagged WT and Δ cat forms of HS3STs was analyzed by confocal microscopy. In addition, the precise localization of the fluorescent proteins was delineated by immunofluorescence staining with organelle-specific antibodies labeled with Alexa-488. The fluorescent signals obtained from HS3ST3A-WT-RFP and HS3ST3A- Δ cat-RFP were mainly concentrated in intracellular organelles that are close to the nucleus (Figure 2A). Overlapping with the green fluorescence of the *cis*-Golgi marker GM130 confirmed that this fraction was localized in the Golgi apparatus. However, a minor fraction of both forms of HS3ST3A was also visualized in small vesicles and at the plasma membrane. These first results suggested that HS3ST3A is mainly a Golgi-resident enzyme, but it can be addressed to the plasma membrane. The fact that similar membrane localization was observed for both constructs revealed that the cytoplasmic tail, transmembrane domain or stem region of HS3ST3A probably contains a sorting signal that directs the enzyme outside of the Golgi apparatus. As shown in Figure 2B, both HS3ST3B-WT-RFP and HS3ST3B- Δ cat-RFP constructs were similarly localized with GM130, which indicates that HS3ST3B is entirely confined within the Golgi apparatus. Unlike the two other HS3STs, we found that the truncated and WT forms of HS3ST2 displayed distinct intracellular staining (Figure 2C). In our hands, HS3ST2- Δ cat-RFP colocalized with GM130, confirming its localization in the Golgi apparatus. HS3ST2-WT-RFP, however, was visualized in other intracellular compartments. The observation that it overlapped with calnexin suggested that the WT tagged form of HS3ST2 was retained in the endoplasmic reticulum (ER). Such localization could be due to a defective protein folding, which may explain that it was sequestered in the ER for degradation (Ruggiano *et al.*, 2014).

Overexpression of HS3ST2 and HS3ST3A in HeLa cells

To overcome the problem of HS3ST2 misfolding, we decided to transfect HeLa cells with an expression vector encoding a full-length and non-tagged form of HS3ST2. First, we confirmed the expression of recombinant HS3ST2 in our model by Western blot. Anti-HS3ST2 antibody specifically reacted with immunoreactive proteins, for which the apparent molecular weights varied from 45 to 55 kDa (Figure 3A). PNGase treatment reduced the number of reactive bands of higher molecular weights, which indicates that immunoreactive proteins corresponded to *N*-glycosylated forms of HS3ST2 (data not shown). These results revealed that the recombinant enzyme was efficiently produced in HeLa cells at the expected molecular weight and validated anti-HS3ST2 antibody for next experiments. After transfection with the expression vector, HeLa cells were fixed, permeabilized and incubated with anti-HS3ST2 antibodies. Thereafter, cells were incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa-568 and the fluorescence signal was analyzed by confocal microscopy.

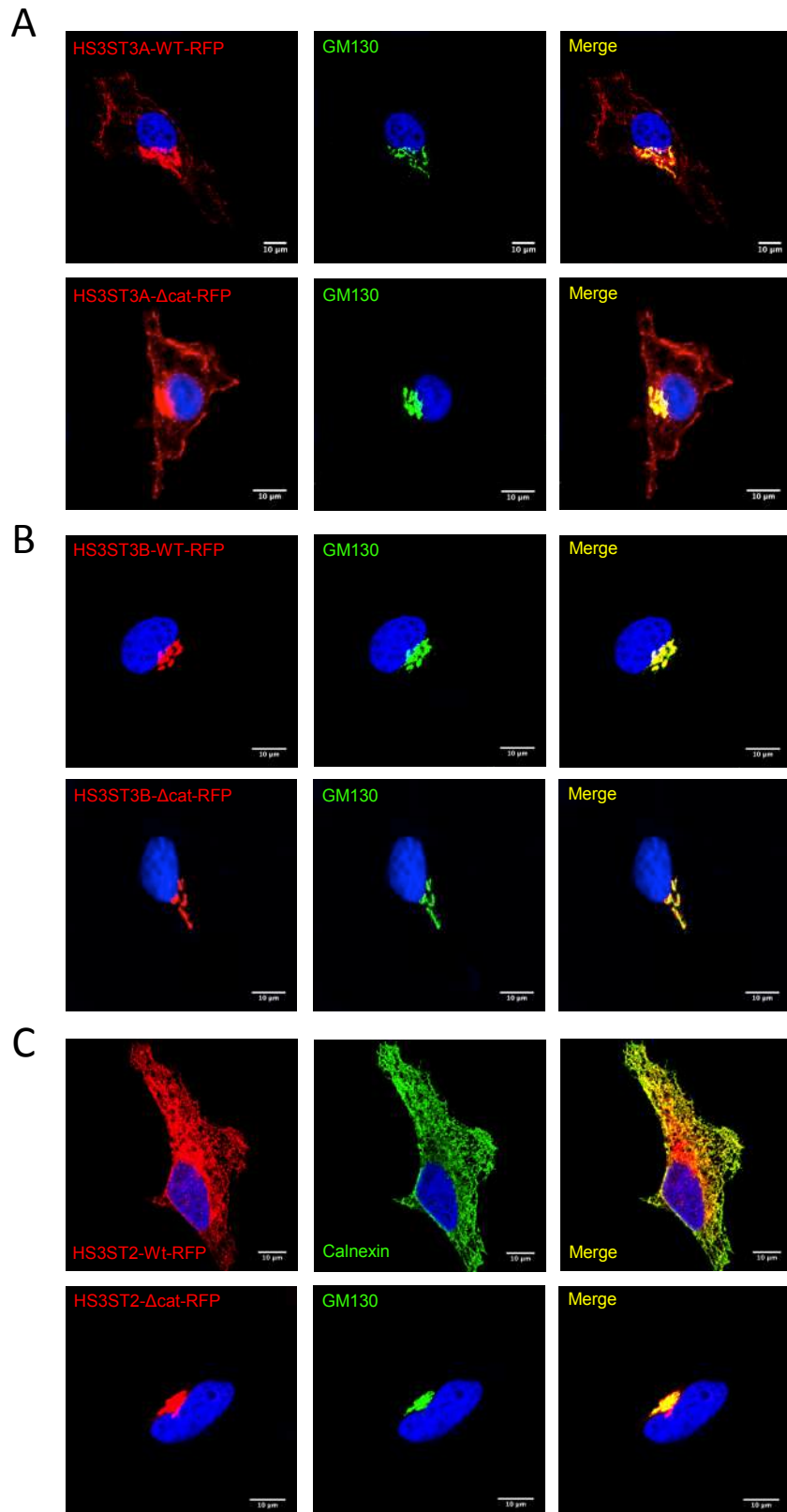


Figure 2. Subcellular localization of fluorescent forms of HS3ST3A, HS3ST3B and HS3ST2. HeLa cells were transiently transfected with expression vectors encoding the RFP tag coupled to full-length (WT) or truncated (Δ cat) forms of HS3ST3A (**A**), HS3ST3B (**B**) or HS3ST2 (**C**). In parallel, cells were double-labeled with antibodies to GM130 (Golgi marker)

or calnexin (ER marker), and secondary antibody conjugated to Alexa-488 was used to highlight in green both markers. Nuclei were stained in blue with DAPI. Representative microscopy images of the expression of WT and Δ cat forms of HS3STs (left panels) and organelles markers (middle panels) are shown in red and green fluorescence, respectively. Right panels show merged images. Scale bar = 10 μ m.

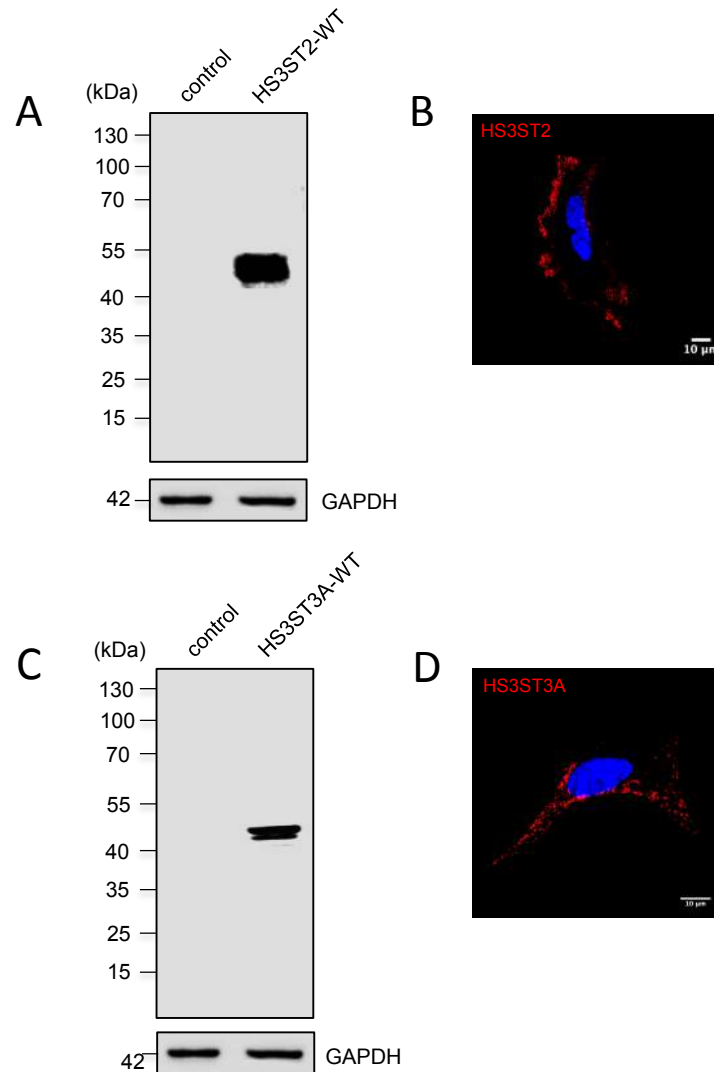


Figure 3. Subcellular localization of non-tagged HS3ST2 and HS3ST3A. HeLa cells were transiently transfected with expression vectors encoding non-tagged forms of full-length HS3ST2 (**A, B**) or HS3ST3A (**C, D**). The expression of each enzyme was verified by Western blot with specific antibodies to HS3ST2 (**A**) and HS3ST3A (**C**). Parallel immunoblotting with anti-GAPDH confirmed equal loading of the samples. For fluorescence analysis, HeLa cells were fixed, permeabilized and then incubated in the presence of anti-HS3ST2 (**B**) and anti-HS3ST3A (**D**). Thereafter, cells were immunostained with secondary antibodies conjugated to Alexa-568. Nuclei were stained in blue with DAPI. Representative microscopy images of the expression of HS3STs are shown in red fluorescence. Scale bar = 10 μ m.

As shown in Figure 3B, immunostaining was mainly visualized at the plasma membrane of HeLa cells, which revealed that HS3ST2 was addressed outside of the Golgi apparatus. Given that HS3ST2- Δ cat-RFP was detected into the Golgi apparatus, these last results suggest that the catalytic domain of HS3ST2 may support the unexpected localization of the enzyme to the plasma membrane.

In order to check whether unconventional localization of fluorescent HS3ST3A constructs was not due to an artifact, we reproduced the same experiments with a recombinant form of HS3ST3A without fluorescent tag. HeLa cells were transiently transfected with an expression vector encoding a full-length and non-tagged form of HS3ST3A and the expression of the enzyme was verified by Western blot with a specific anti-HS3ST3A antibody (Figure 3C). As above, we confirmed efficient expression of HS3ST3A in transfected cells, and PGNase treatment revealed the presence of at least two *N*-glycosylated forms of the enzyme with apparent molecular weights of ~ 50 kDa. We then analyzed the subcellular localization of recombinant HS3ST3A by using the same antibody. As shown in Figure 3D, the results were similar to the ones obtained with RFP-tagged constructs of the enzyme. Non-tagged HS3ST3A was indeed localized in the Golgi apparatus and intracellular vesicles close to the plasma membrane.

Collectively, these results revealed that HS3ST2, HS3ST3A and HS3ST3B display different subcellular localizations. While HS3ST3B is a normal Golgi-resident enzyme, HS3ST2 and a fraction of HS3ST3A are addressed outside the Golgi apparatus, which suggests that these three isoenzymes may have distinct functions.

Effect of the co-expression of HS3STs on their subcellular localization

We reported in previous works that HS3ST2 and HS3ST3B are differentially expressed in monocytes/macrophages depending on the inflammatory environment, while the expression of HS3ST3A remains unchanged (Martinez *et al.*, 2015). Hence, we analyzed whether the expression of one isoenzyme may compromise the localization of another one in our cellular model (Figure 4). For the experiments of co-expression with HS3ST3A and HS3ST3B, an expression vector for a GFP-tagged form of HS3ST3A was constructed. Thereafter, HeLa cells were transfected with HS3ST3A-WT-GFP and HS3ST3B-WT-RFP and analyzed for the localization of fluorescent proteins by confocal microscopy. As shown in Figure 4A, the green and red fluorescence signals overlapped in the Golgi apparatus, which confirmed our previous results. Moreover, a green fluorescent signal was also visualized in intracellular vesicles and at the plasma membrane. These results indicated that the expression of HS3ST3B did not modify the localization of HS3ST3A and vice-versa. For the other experiments, we used GFP-tagged HS3ST3A or RFP-tagged HS3ST3B in combination

with the non-tagged form of HS3ST2. When compared to the results obtained with one isoenzyme, we found that simultaneous expressions of HS3ST3A or HS3ST3B with HS3ST2 did not modify the localization of each isoenzyme (Figures 4B and 4C). Most interestingly, we did not observe any co-localization of HS3ST2 and HS3ST3A. Even though both were addressed outside the Golgi apparatus, these last findings revealed that they did not accumulate in the same areas.

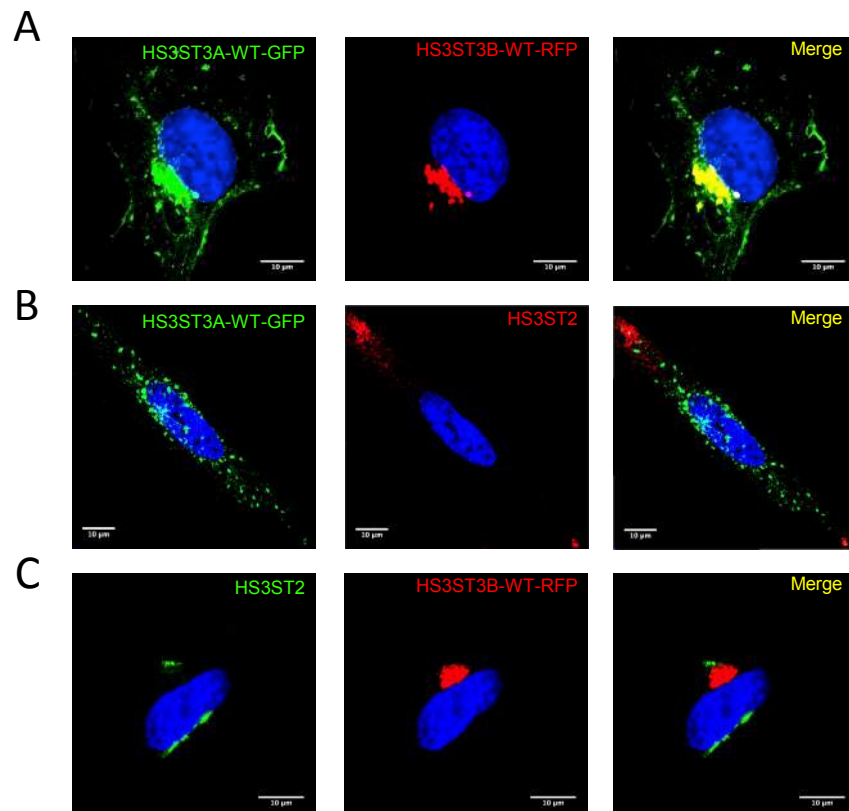


Figure 4. Co-expression of HS3STs in HeLa cells. HeLa were co-transfected with expression vectors encoding full-length forms of HS3STs. Three combinations of double transfection were used as follows: HS3ST3A-WT-GFP with HS3ST3B-WT-RFP (**A**), HS3ST3A-WT-GFP with HS3ST2-WT (**B**); HS3ST2-WT with HS3ST3B-RFP (**C**). The expression of HS3ST3A and HS3ST3B was visualized by the green and red fluorescence signals of GFP and RFP tags, respectively. The expression of HS3ST2 was immunodetected with specific antibodies and visualized with secondary antibodies conjugated to Alexa-568 (red signals) (**B**) or Alexa-488 (green signals) (**C**). DAPI staining was performed to show the nucleus. Representative fluorescence microscopy images of the expression of each HS3ST are shown in left and middle panels. Right panels show merged images of the combinations. Scale bar = 10 μm.

Subcellular localization of HS3STs with syndecans

According to their plasma membrane localization, we hypothesized that HS3ST2 and HS3ST3A may localize with an HS proteoglycan, and more precisely with a member of the syndecan family. The four syndecans exhibit different expression profiles depending on cell type. Hence, we first established their expression profile in HeLa cells by real-time RT-PCR. We found that the transcript encoding syndecan-2 was the main syndecan mRNA expressed in HeLa cells. Syndecan-1 and -4 mRNAs were expressed at lower level, while syndecan-3 mRNA was barely detected. The presence of syndecan-1, -2 and -4 in HeLa cells was then confirmed by immunofluorescence with anti-syndecan antibodies and secondary antibodies conjugated to Alexa-488. As already reported by others (Araki *et al.*, 2009; Suffee *et al.*, 2012; Renga *et al.*, 2014), we observed fluorescent staining of syndecans at the plasma membrane and also in some intracellular compartments, which may be related to the intracellular trafficking of these proteoglycans (Figure 5A).

We then examined whether HS3ST3A and HS3ST2 shared common localization with syndecans. To this end, the vector encoding RFP-tagged HS3ST3A was first transfected in HeLa cells and the expression of syndecans were analyzed by immunofluorescence as above. We did not observe any overlapping between the signal of HS3ST3A-WT-RFP and the fluorescent staining of either syndecan-2 (Figure 5B) or syndecan-1 (data not shown). In contrast, we found that the red fluorescence signal of HS3ST3A merged, at least in part, with the green immunostaining of syndecan-4, which revealed a partial co-localization between both molecules in intracellular vesicles and at the plasma membrane. In next experiments, HeLa cells were transfected with the expression vector encoding the non-tagged form of HS3ST2. Following their permeabilization, cells were incubated with antibodies to HS3ST2 and syndecans, and reactive proteins were fluorescently stained with secondary antibodies conjugated to Alexa-568 and Alexa-488, respectively. As shown in Figure 5C, we found that the fluorescent staining of HS3ST2 and syndecan-2 merged in some areas of the plasma membrane, indicating a partial co-localization of the isoenzyme with this proteoglycan. In contrast, we did not observe any overlapping between the fluorescence signals of HS3ST2 and either syndecan-4 (Figure 5C) or syndecan-1 (data not shown). Thus, the findings that HS3ST3A and HS3ST2 specifically co-localized with different syndecans suggest that they may have distinct functions in some specialized cellular compartments.

To decipher the functional relationships between both HS3STs and syndecan-2 and syndecan-4, we decided to silence the expression of each proteoglycan by RNA interference. Treatment of HeLa cells with specific siRNA targeting syndecan-2 or syndecan-4 resulted in a significant down-regulation of corresponding mRNA. After 24 h of transfection, the inhibitory effects of siRNA were estimated at 82 % and 89 % respectively, when compared to

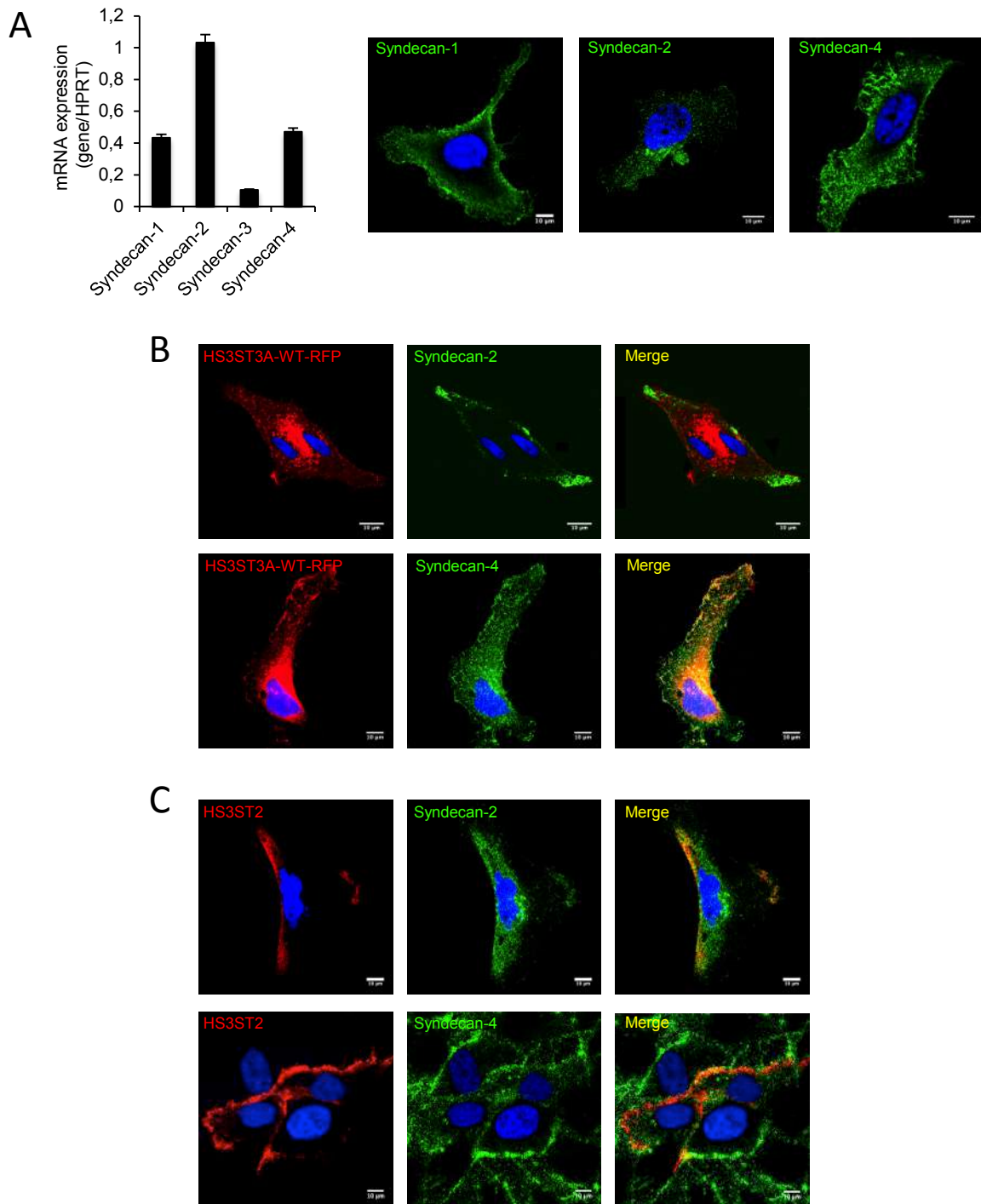


Figure 5. Colocalization of HS3ST3A and HS3ST2 with syndecans in HeLa cells. (A) The endogenous expression of syndecans was analyzed by RT-qPCR and by immunofluorescence microscopy. Following reverse transcription of RNA extracted from HeLa cells, mRNA levels of syndecans was quantified by RT-qPCR. Relative transcript abundance was normalized to HPRT mRNA. Data are means \pm S.D. from five separate experiments. For fluorescence analysis, cells were permeabilized and incubated in the presence of specific antibodies to each syndecan. Thereafter, immunoreactive syndecans were stained with secondary antibodies conjugated to Alexa-488. For the experiments of colocalization, HeLa cells were transiently transfected with the expression vectors encoding

HS3ST3A-WT-RFP (**B**) or HS3ST2-WT (**C**) for 24 h, after which time they were permeabilized for immunofluorescence analysis of endogenous syndecan-2 and syndecan-4. Nuclei were stained in blue with DAPI. Representative microscopy images of the expression of HS3STs (left panels) and syndecans (middle panels) are shown in red and green fluorescence, respectively. Right panels show merged images. Scale bar = 10 μ m.

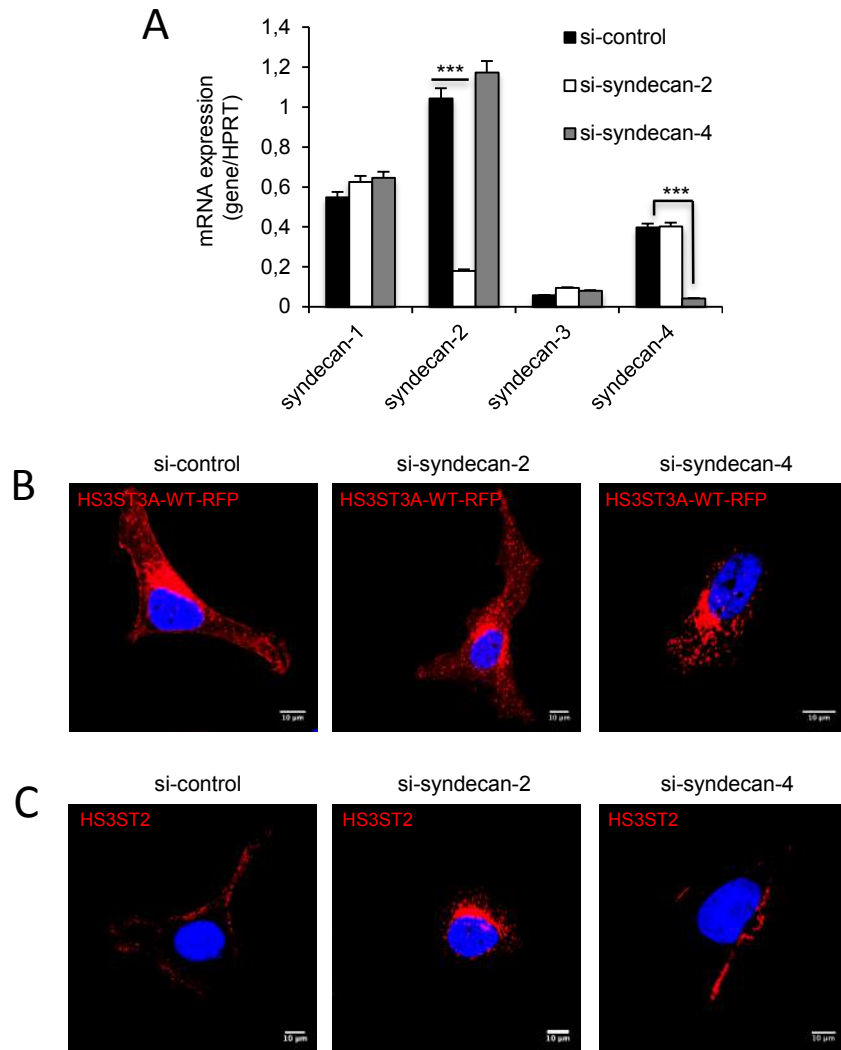


Figure 6. Localization of HS3ST3A and HS3ST2 in syndecan-deficient HeLa cells. HeLa cells were transfected with negative control siRNA (si-control) or specific siRNA targeting either syndecan-2 (si-syndecan-2) or syndecan-4 (si-syndecan-4). (**A**) The efficacy of each siRNA to down-regulate the expression of syndecans was verified by RT-qPCR. Relative transcript abundance was normalized to HPRT mRNA. Data are means \pm S.D. of five independent experiments ($***P < 0.001$, significantly different when compared to cells transfected with negative control siRNA). Following treatment with siRNA for 24 h, HeLa cells were transiently transfected with plasmids encoding HS3ST3A-WT-RFP (**B**) or HS3ST2-WT (**C**). The expression of HS3ST3A was visualized by the fluorescence signals of RFP tag. HS3ST2 was detected with specific antibodies and fluorescently stained with secondary antibodies conjugated to Alexa-568. Nuclei were stained in blue with DAPI. Representative microscopy images of the expression of HS3STs are shown in red fluorescence. Scale bar = 10 μ m.

the results obtained with the negative control siRNA. Moreover, we found that the expression of mRNA encoding syndecan-2 was not significantly altered by the siRNA that targeted syndecan-4, and vice-versa. These results confirmed the efficiency and specificity of both siRNA used in this study (Figure 6A). We next examined the cellular localization of HS3ST3A and HS3ST2 in siRNA-treated HeLa cells. To this end, HeLa cells were first treated with specific siRNA for 24 h and then transfected with either HS3ST3A-WT-RFP or non-tagged HS3ST2. Thereafter, the subcellular localization of each isoenzyme was analyzed by confocal microscopy as above. As expected, cell treatment with the negative control siRNA did not hamper the subcellular localization of both HS3STs. Silencing the expression of syndecan-2 had no effect on the localization of HS3ST3A, as shown in Figure 6B. Conversely, down-regulating the expression of syndecan-4 had a notable effect on the localization of this isoenzyme. RFP-tagged HS3ST3A was indeed enriched in the Golgi apparatus, with a consequent decrease in the fraction that was distributed in intracellular vesicles and at the plasma membrane. On the other hand, silencing the expression of syndecan-2 dramatically altered the cellular localization of HS3ST2 in HeLa cells, when compared to control cells. Fluorescent staining of the enzyme was no more observed at the plasma membrane but rather in intracellular vesicles, which indicates that the proteoglycan was required to address HS3ST2 outside the Golgi apparatus. In contrast, the localization of the enzyme was not modified in cells that were deficient in the expression of syndecan-4 (Figure 6C). Collectively, these results support a model in which syndecan-2 and -4 may participate in the trafficking and consequent localization of HS3ST2 and HS3ST3A into distinct intracellular compartments, respectively.

Localization of endogenous HS3ST2 and syndecan-2 in primary macrophages

We previously reported that primary macrophages express high level of HS3ST2 (Martinez *et al.*, 2015). To validate the results obtained with ectopic expression of this enzyme in HeLa cells, we reproduced the same experiments with human macrophages derived from blood monocytes. First, we examined the expression of syndecans by real-time RT-PCR and we found that syndecan-2 was the main representative of this proteoglycan family in primary macrophages (Figure 7A). Thereafter, we analyzed the localization of endogenous HS3ST2 and syndecan-2 by immunofluorescence. To this end, permeabilized macrophages were incubated with antibodies to HS3ST2 and syndecan-2, after which fluorescent staining was performed by using secondary antibodies conjugated to Alexa-568 and Alexa-488, respectively. As shown in Figure 7B, fluorescence staining of HS3ST2 was confined to the plasma membrane of macrophage, which was in agreement with the localization observed in our model of ectopic HS3ST2 expression in HeLa cells. Moreover,

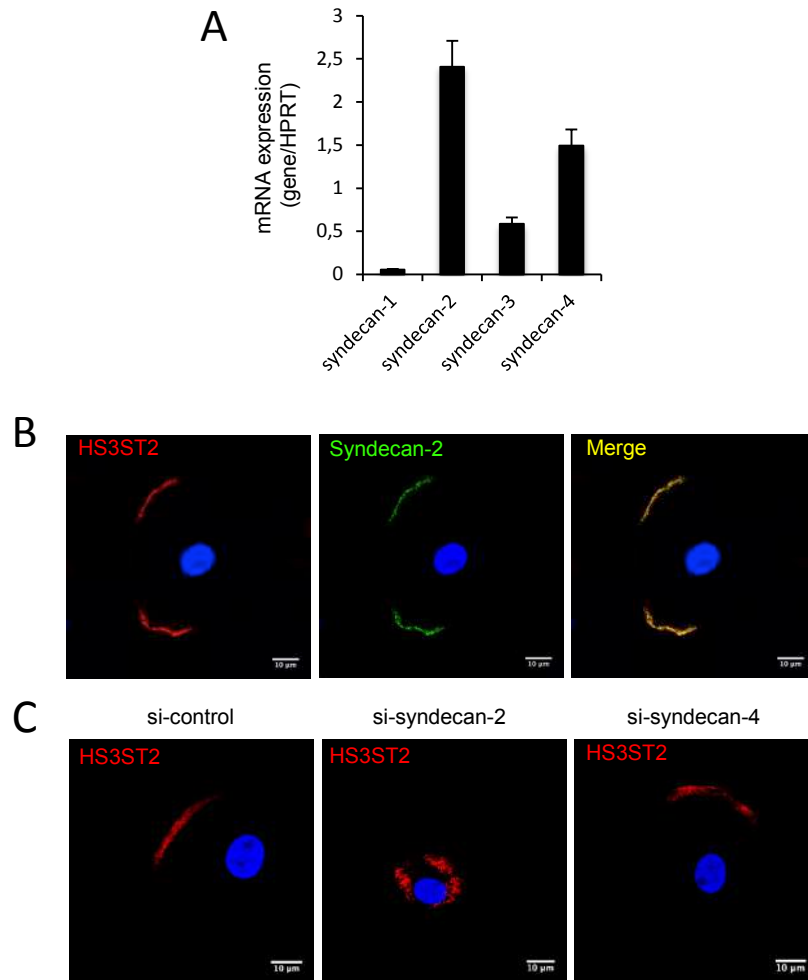


Figure 7. Colocalization of HS3ST2 with syndecan-2 in primary macrophages. (A) The endogenous expression of syndecans was analyzed by RT-qPCR. Following reverse transcription of RNA extracted from primary macrophages, the level of mRNA for the four syndecans was quantified by RT-qPCR. Relative transcript abundance was normalized to HPRT mRNA. Data are means \pm S.D. and were obtained with macrophages from six different donors. (B) Colocalization of endogenous HS3ST2 and syndecan-2 in macrophages was analyzed by immunofluorescence. Following cell permeabilization, HS3ST2 and syndecan-2 were detected with rabbit anti-HS3ST2 and mouse anti-syndecan-2 antibodies. Thereafter, cells were fluorescently stained with Alexa 568-conjugated anti-rabbit antibodies and Alexa 488-conjugated anti-mouse antibodies. DAPI staining was performed to show the nucleus. Representative microscopy images of the expression of HS3ST2 (left panel) and syndecan-2 (middle panel) are shown in red and green fluorescence, respectively. Merge image (right panel) indicates a total yellow colocalization. (C) HS3ST2 localization in syndecan-2-deficient macrophages was analyzed by confocal microscopy. Following treatment of macrophages with negative control siRNA (si-control) or specific siRNA targeting either syndecan-2 (si-syndecan-2) or syndecan-4 (si-syndecan-4), HS3ST2 was detected with specific antibodies and fluorescently stained with secondary antibodies conjugated to Alexa-568. Nuclei were stained in blue with DAPI. Representative microscopy images of the expression of HS3ST2 are shown in red fluorescence. Scale bar = 10 μ m.

we found that the red fluorescence signal, which corresponds to endogenous HS3ST2, perfectly merged with the green fluorescent staining of syndecan-2. Thus, these results revealed that HS3ST2 and syndecan-2 are both localized in the same areas at the plasma membrane of macrophages. In order to confirm the functional relationships between HS3ST2 and syndecan-2, we reproduced silencing experiments with specific siRNA to syndecan-2 and syndecan-4. As expected, we found that each siRNA was as effective in macrophages as in HeLa cells to reduce the expression of corresponding syndecan, without sharing any cross-reactivity. Treatment of macrophages with negative control siRNA or specific siRNA to syndecan-4 did not modify the localization of HS3ST2. Fluorescence staining was indeed observed at the cell membrane in both cases. In contrast, silencing the expression of syndecan-2 strongly altered the cellular distribution of HS3ST2. When compared to control cells, fluorescent staining of HS3ST2 was no more observed at the plasma membrane, but confined in intracellular vesicles (Figure 7C). Thus, these last results lend support for the hypothesis that syndecan-2 is required for the trafficking and consequent localization of HS3ST2 to the plasma membrane of macrophages.

Discussion

The biological functions of HS rely on their ability to create interactions with a large repertoire of proteins. These interactions are mainly dependent on the density and the position of sulfate groups into glycan backbone, which are results of the combined actions of HS sulfotransferases acting in the Golgi apparatus. Thereby, the differential expression of these enzymes depending on the cellular environment is likely to control the synthesis of HS motifs with distinct structural features and functions. HS3ST2, HS3ST3A and HS3ST3B were reported to catalyze the same reaction of 3-O-sulfation *in vitro* by transferring a sulfate group to the 3-OH position of GlcNS or GlcNH₂ adjacent to IdoUA2S residues. With HS3ST4 and HS3ST6, they were often referred to as gD-type HS3STs, given that they provide HS binding sites for the glycoprotein gD of HSV-1 (Liu *et al.*, 1999a, 1999b; Shukla *et al.*, 1999; Thacker *et al.*, 2014). Nevertheless, the diversification of HS3ST subfamily suggests that there might have distinct substrate specificity *in vivo*. While HS3ST2, HS3ST3A and HS3ST3B shared greater than 80 % sequence identity in the sulfotransferase domain, their structure diverged by the N-terminal cytoplasmic tail, the transmembrane domain and the stem region. These distinct structural features would be in favor of specific subcellular localization and consequent interactions with distinct partners, which might argue for their substrate specificity *in vivo*.

In the current work, we have then examined the subcellular localization of HS3ST2, HS3ST3A and HS3ST3B by using expression vectors encoding fluorescent forms of each

isoenzyme, which were deleted or not from their catalytic domain. We found that HS3ST3B and HS3ST3A are localized in the Golgi apparatus, which is consistent with that is known for other enzymes involved in HS biosynthesis. Co-localization with Golgi marker revealed that HS3ST3B was confined in this compartment, indicating that it is a strict Golgi-resident enzyme. Moreover, full-length and truncated constructs of HS3ST3B were both detected in the same compartment, which revealed that the catalytic domain is not important for the mechanism of retention. Thus, HS3ST3B could use retention strategies as for the majority of Golgi-resident enzymes examined to date, for which Golgi retention can be established *via* the cytoplasmic, transmembrane or luminal stem domains (Banfield, 2011). On another hand, protein oligomerization *via* the stem regions has been already described for HS6STs within the Golgi (Nagai *et al.*, 2004). In the same way, HS3ST3B could associate with others enzymes as homo- or hetero-oligomers and thereby be excluded from transport vesicles as it is in large complexes, resulting in its retention in the Golgi (Banfield, 2011). In contrast to HS3ST3B, the mechanism for the retention HS3ST3A in Golgi apparatus seems to be different. Indeed, we found that the distribution of HS3ST3A did not entirely merged with the localization of HS3ST3B, as it was also distributed in intracellular vesicles outside the Golgi and close to the plasma membrane. While sharing nearly 100 % sequence identity in the sulfotransferase domain, both isoenzymes strongly diverge in others domains. This is consistent with the findings that both RFP-tagged HS3ST3A constructs stained the same intracellular behavior, which revealed that this localization did not require the sulfotransferase catalytic domain. Unlike HS3ST3B, HS3ST3A could then be present in the Golgi as a monomeric form and thereby be transported by vesicles from the Golgi apparatus to the plasma membrane. Nevertheless, non-conventional localization of enzymes outside of the Golgi apparatus has been the subject of debate, because of the ectopic expression of fluorescently tagged proteins. For the avoidance of doubt, we compared the distribution of RFP-tagged and non-tagged forms of HS3ST3A. We found that both proteins displayed the same subcellular localization, which rules out any interference of the fluorescent tag. We then demonstrated that silencing the expression of syndecan-4 resulted in a reduced trafficking of HS3ST3A outside of the Golgi apparatus, which suggested that this proteoglycan may be involved in the trafficking of the enzyme. Baietti *et al.* (2012) reported that syndecans and their cytoplasmic adaptor syntenin are involved in the formation of exosomes. These vesicles represent an important tool for intercellular communication and therefore play a key role in the regulation of physiological and pathological processes (Columbo *et al.*, 2014). They are released by many cell types when multivesicular endosomes fuse with the plasma membrane at the end of the endocytic recycling pathway. Therefore, our findings suggest that HS3ST3A could be loaded in exosomes with syndecan-4. Further investigation will be helpful for supporting this model.

In contrast to HS3ST3A and HS3ST3B, we found that the RFP-tagged forms of HS3ST2 were not localized in the same compartment. While the truncated enzyme was addressed to the Golgi apparatus, the full-length RFP-tagged form remained in the ER, indicating that it was certainly misfolded. Thus, we decided to use an expression vector encoding a non-tagged form of the enzyme. Following cell transfection, HS3ST2 was detected with a specific antibody and indirect immunofluorescence staining. By using this approach, we found an unexpected localization of the immunoreactive protein at the plasma membrane. That the truncated form of HS3ST2 was retained in the Golgi compartment indicates that the sulfotransferase catalytic domain is probably required for the unconventional localization of the full-length enzyme. Moreover, we did not observe any overlapping between HS3ST2 and HS3ST3A, which revealed that both enzymes were not directed into the same compartments. We then examined the localization of HS3ST2 with that of syndecans. In contrast to HS3ST3A, we did not observe any co-localization with syndecan-4, which was in agreement with the findings that both isoenzymes did not localize in the same areas. Conversely, the membrane staining of HS3ST2 was found to overlap with that of syndecan-2, suggesting a co-localization of both molecules at the cell membrane. Moreover, we showed that silencing the expression of this proteoglycan resulted in a complete loss of HS3ST2 at the plasma membrane and in a consequent accumulation of the enzyme into intracellular organelles. These results suggest that syndecan-2 is probably required for addressing HS3ST2 to the plasma membrane. Since exportation to the cell surface appeared dependent on the sulfotransferase catalytic domain, it may be speculated a trapping mechanism of HS3ST2 by syndecan-2. *Via* interaction with HS moieties, syndecan-2 could drive a directional transport of HS3ST2 from the Golgi to vesicles at the cell surface. Further investigations are currently in progress to decipher the molecular interaction between HS3ST2 and syndecan-2 and to know whether both molecules are present in focal adhesive plaques.

Several studies have used overexpression systems to demonstrate the Golgi localization of enzymes involved in HS biosynthesis, including EXT1, EXT2, C5-epimerase, HS2ST, HS6STs (McCornick *et al.*, 2000; Pinhal *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2004). Thus, the finding that HS3ST2 is addressed outside the Golgi apparatus to the plasma membrane was unexpected. However, such an unconventional localization of an HS-modifying enzyme could be an artifact of the expression system in HeLa cells. Thus, we analyzed the localization of endogenous HS3ST2 in macrophages, as we previously reported that the enzyme was expressed at high level within these cells (Martinez *et al.*, 2015). We found that the localization of HS3ST2 in macrophages perfectly matched with the distribution of the overexpressed enzyme in HeLa cells, which excludes the possibility that non-conventional localization of HS3ST2 could be an artifact. Moreover, we found that the enzyme perfectly

co-localized with syndecan-2 at the membrane of macrophages. Silencing the expression of the proteoglycan altered the localization of HS3ST2, which confirmed the functional association between both molecules. Such a non-conventional localization of an enzyme supposed to be Golgi-resident has been already reported for some glycosyltransferases, including β 1,4-galactosyltransferase. Because sugar nucleotides are normally not present in the extracellular medium, it has been suggested that surface-localized glycosyltransferases may form adhesive bonds with glycan substrates in the extracellular matrix or on the membrane of adjacent cells in a lectin-like fashion (Shur *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2014). Hence, such an interacting function might be extrapolated for HS3ST2 at the surface of macrophages, which will highlight a new function for an HS sulfotransferase.

In conclusion, we demonstrated for the first time that certain HS3ST isoenzymes display distinct subcellular localization, with an unexpected addressing of HS3ST2 and, at least in part, of HS3ST3A outside of the Golgi apparatus. In our previous works, we reported that macrophage polarization modified the profiles of expression of numerous HS sulfotransferases. The striking difference between M1 and M2 macrophage subtypes was observed within the expression of HS3ST2 and HS3ST3B. While HS3ST2 was higher expressed in M2 macrophages, it was rapidly repressed upon M1 polarization. In contrast, HS3ST3B was strongly induced in M1 macrophages, which indicates that inflammatory stimuli differentially control the expression of both isoenzymes (Martinez *et al.*, 2015). Because the structure of HS is mainly the consequence of the specific cell-type expression and activity of sulfotransferases, the differential expression and subsequently distinct localization of HS3ST2, HS3ST3A and HS3ST3B suggests that these isoenzymes may be involved in different functions depending on macrophage environment.

Conflicts of interest: No potential conflict of interest was disclosed

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Lille. We are grateful to Sven Potelle (UMR 8576 CNRS, Lille) for helpful discussion.

References

Araki E, Momota Y, Togo T, Tanioka M, Hozumi K, Nomizu M, Miyachi Y & Utani A (2009) Clustering of syndecan-4 and integrin beta1 by laminin alpha 3 chain-derived peptide promotes keratinocyte migration. *Mol Biol Cell* 20, 3012-3024.

- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P & David G (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14, 677-685.
- Banfield DK (2011) Mechanisms of protein retention in the Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a005264.
- Colombo M, Raposo G & Théry C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 255-289.
- Couchman JR (2010) Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 89-114.
- Deligny A, Denys A, Marcant A, Melchior A, Mazurier J, van Kuppevelt TH *et al.* (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.
- Esko JD & Selleck SB (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* 71, 435-471.
- Kobayashi S, Morimoto K, Shimizu T, Takahashi M, Kurosawa H & Shirasawa T (2000) Association of EXT1 and EXT2, hereditary multiple exostoses gene products, in Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 860-867.
- Lambaerts K, Wilcox-Adelman SA & Zimmermann P. (2009) The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol* 21, 662-669.
- Liu J, Shworak NW, Sinaÿ P, Schwartz JJ, Zhang L, Fritze LM & Rosenberg RD (1999a) Expression of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase isoforms reveals novel substrate specificities. *J Biol Chem* 274, 5185-5192.
- Liu J, Shriver Z, Blaiklock P, Yoshida K, Sasisekharan R & Rosenberg RD (1999b) Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues. *J Biol Chem* 274, 38155-38162.
- Martinez P, Denys A, Delos M, Sikora A-S, Carpentier M, Julien S *et al.* (2015) Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* 25, 502-513.
- McCormick C, Duncan G, Goutsos KT & 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 USA* 97, 668-673.
- Morgan MR, Humphries MJ & Bass MD (2007) Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 957-969.

- Mortier A, Van Damme J & Proost P (2012) Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett* 145, 2-9.
- Nagai N, Habuchi H, Esko JD & Kimata K (2004) Stem domains of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase are required for Golgi localization, oligomer formation and enzyme activity. *J Cell Sci* 117, 3331-3341.
- O'Donnell CD, Tiwari V, Oh M-J & Shukla D (2006) A role for heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread. *Virology* 346, 452-459.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002-2007.
- Pinhal MA, Smith B, Olson S, Aikawa J, Kimata K & Esko JD (2001) Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 12984-12989.
- Presto J, Thuveson M, Carlsson P, Busse M, Wilén M, Eriksson I, Kusche-Gullberg M & Kjellén L (2008) Heparan sulfate biosynthesis enzymes EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 4751-4756.
- Renga B, Francisci D, Schiaroli E, Carino A, Cipriani S, D'Amore C, Sidoni A, Sordo RD, Ferri I, Lucattelli M, Lunghi B, Baldelli F, Fiorucci S (2014) The HIV matrix protein p17 promotes the activation of human hepatic stellate cells through interactions with CXCR2 and Syndecan-2. *PLoS One* 9, e94798.
- Ruggiano A, Foresti O & Carvalho P (2014) Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol.* 204, 869-887
- Sarrazin S, Lamanna WC & Esko JD (2011) Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, pii: a004952.
- Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD & Spear PG (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99, 13-22.
- Shur BD, Evans S & Lu Q (1998) Cell surface galactosyltransferase: current issues. *Glycoconj J* 15, 537-548.
- Sikora AS, Delos M, Martinez P, Carpentier M, Allain F, Denys A (2016) Regulation of the Expression of Heparan Sulfate 3-O-Sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by Inflammatory Stimuli in Human Monocytes. *J Cell Biochem* 117, 1529-1542.

- Suffee N, Hlawaty H, Meddahi-Pelle A, Maillard L, Louedec L, Haddad O, Martin L, Laguillier C, Richard B, Oudar O, Letourneur D, Charnaux N & Sutton A (2012) RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis* 15, 727-744.
- Sun X, Wu Y, Wang Y, Xue Q, Cheng X, Zhang G, Zhu Y & Wang X (2014) β -1,4-galactosyltransferase-I activates proliferation and participates in intercellular contacts of lymphocytes. *Hum Immunol* 75, 1019-1025.
- Thacker BE, Xu D, Lawrence R & Esko JD (2014) Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol* 35, 60-72.
- Tiwari V, O'donnell C, Copeland RJ, Scarlett T, Liu J & Shukla D (2007) Soluble 3-O-sulfated heparan sulfate can trigger herpes simplex virus type 1 entry into resistant Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Gen Virol* 88, 1075-1079.
- Xia G, Chen J, Tiwari V, Ju W, Li J-P, Malmstrom A *et al.* (2002) Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1. *J Biol Chem* 277, 37912-37919.
- Xu D, Tiwari V, Xia G, Clement C, Shukla D & Liu J (2005) Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem J* 385, 451-459.

4. Discussion

Grâce à leur capacité d'interaction avec de nombreux ligands protéiques, les HS jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques. Ces interactions sont principalement dépendantes de la densité et de la position des groupements sulfates au sein de la chaîne HS, qui sont le résultat de l'action combinée des HS sulfotransférases dans l'appareil de Golgi. En outre, l'expression de ces différentes enzymes varie en fonction du type cellulaire et de leur environnement, ce qui est susceptible de conduire à la génération de motifs HS distincts possédant des structures et des fonctions spécifiques. Les 3-OST2, 3A et 3B catalysent la même de 3-O-sulfatation *in vitro* en transférant un groupement sulfate sur la fonction hydroxyle de résidus de GlcNS ou GlcNH₂ à proximité immédiate d'un résidu IdoUA2S. Elles sont regroupées, avec les 3-OST4 et 3-OST6, sous la dénomination 3-OST de type gD, étant donné qu'elles sont à l'origine des motifs HS de fixation de la protéine gD du virus HSV-1 (Liu *et al.*, 1999a, 1999b; Shukla *et al.*, 1999; Thacker *et al.*, 2014). Toutefois, la présence de plusieurs isoenzymes au sein de cette sous-famille suggère qu'elles possèdent une spécificité de substrat plus étroite *in vivo*. Les 3-OST2, 3A et 3B

possèdent plus de 80% d'homologie de séquence au niveau du domaine sulfotransférase. En revanche, elles divergent au niveau de leur extrémité *N*-terminale, qui contient les domaines cytoplasmique et transmembranaire, ainsi que la région tige. Ces différences structurales soutiennent l'hypothèse d'une localisation subcellulaire spécifique pour chaque isoenzyme et par conséquent des interactions avec des partenaires distincts, ce qui pourrait être à l'origine de différences de spécificités de substrats *in vivo*.

Au cours de cette étude, nous avons étudié la localisation subcellulaire des 3-OST2, 3A et 3B en utilisant des vecteurs d'expression codant pour des formes fluorescentes de chaque isoenzyme, délétée ou non de leur domaine catalytique. Nos résultats montrent que les 3-OST3B et 3A sont localisées dans l'appareil de Golgi, ce qui est accord avec les études réalisées pour les autres enzymes de maturation des HS. La co-localisation totale avec un marqueur golgien révèle que la 3-OST3B est confinée dans ce compartiment, indiquant qu'elle est une enzyme résidente de l'appareil de Golgi. De plus, les constructions réalisées pour la 3-OST3B sont toutes les deux détectées dans le même compartiment, ce qui démontre que le domaine catalytique n'est pas requis pour le mécanisme de rétention. Ainsi, la 3-OST3B peut utiliser des stratégies de rétention communes à la majorité des protéines résidentes de l'appareil de Golgi étudiées à ce jour, pour lesquelles la rétention est établie *via* les domaines cytoplasmiques, transmembranaires et/ou tiges (Banfield, 2011). En outre, les travaux de Nagai *et al.*, 2004 ont décrit l'importance des domaines tiges des 6-OSTs dans la formation de complexe oligomérique et la rétention des enzymes dans le Golgi. De la même manière, la 3-OST3B pourrait être associée avec d'autres enzymes au sein d'homo- ou hétéro-oligomères et être ainsi exclue des vésicules de transport intracellulaires, ce qui conduirait à sa rétention au sein de l'appareil de Golgi (Banfield, 2011). En revanche, le mécanisme à l'origine de la rétention de la 3-OST3A dans l'appareil de Golgi semble être différent. En effet, nos résultats montrent que la distribution cellulaire de la 3-OST3A n'est pas entièrement superposable à celle de la 3-OST3B, puisqu'elle est également présente au sein de vésicules intracellulaires à l'extérieur de l'appareil de Golgi et à proximité de la membrane plasmique. Bien que ces deux isoenzymes partagent presque 100% d'homologie de séquence au niveau du domaine sulfotransférase, leurs séquences diffèrent au niveau des autres domaines. Ces observations sont en accord avec le fait que nos deux constructions pour la 3-OST3A partagent la même localisation intracellulaire, ce qui indique que la localisation subcellulaire de l'enzyme n'est pas dépendante de son domaine catalytique. Contrairement à la 3-OST3B, la 3-OST3A pourrait être présente sous forme monomérique dans l'appareil de Golgi, ce qui lui permettrait d'être acheminée vers la membrane plasmique par le biais de vésicules. Néanmoins, la localisation non conventionnelle d'enzymes à l'extérieur de l'appareil de Golgi a fait l'objet de controverses,

en raison de l'utilisation de protéines chimères fluorescentes. Afin d'écartier tout biais lié à cette stratégie, nous avons comparé la distribution cellulaire des formes étiquetée ou non de la 3-OST3A. Nos résultats montrent une localisation similaire dans les deux cas, éliminant ainsi le fait que la localisation non-golgienne soit due à influence du groupement fluorescent. Nous avons ensuite démontré que l'invalidation d'expression du syndécan-4 entraîne une diminution du trafic de la 3-OST3A à l'extérieur de l'appareil de Golgi, ce qui suggère une implication de ce protéoglycane dans le trafic intracellulaire de l'enzyme. Les travaux de Baietti *et al.* (2012) ont démontré que les syndécans, en association avec la synténine, sont impliqués dans la formation des exosomes. Ces vésicules sont importantes dans les phénomènes de communication intercellulaire et jouent un rôle majeur dans la régulation de processus physiologiques et pathologiques (Colombo *et al.*, 2014). Elles sont sécrétées par de nombreux types cellulaires lorsque les endosomes multi-vésiculaires fusionnent avec la membrane plasmique. Ainsi, nos résultats suggèrent que la 3-OST3A pourrait être présente, au même titre que le syndécan-4, au sein de ces exosomes. Il serait alors intéressant de poursuivre ces travaux pour confirmer cette hypothèse.

Contrairement aux 3-OST3A et 3B, nous avons montré que les deux formes fluorescentes de la 3-OST2 ne sont pas localisées dans le même compartiment. Alors que la forme tronquée de l'enzyme est résidente de l'appareil de Golgi, la forme entière est retrouvée au niveau du réticulum endoplasmique, suggérant une mauvaise conformation. Nous avons donc décidé d'utiliser un vecteur d'expression codant pour une forme non étiquetée de l'enzyme. Après transfection des cellules, la 3-OST2 a été détectée avec un anticorps spécifique par immunofluorescence indirecte. L'utilisation de cette approche a permis de montrer une localisation inhabituelle de l'enzyme, qui est retrouvée au niveau de la membrane plasmique. Le fait que la forme tronquée de la 3-OST2 soit retenue au sein de l'appareil de Golgi indique que le domaine catalytique est nécessaire pour l'adressage de l'enzyme vers la membrane plasmique. De plus, nous n'avons observé aucune co-localisation entre les 3-OST2 et 3-OST3A, révélant ainsi que les deux isoenzymes ne sont pas dirigées vers les mêmes compartiments. Nous avons alors comparé la localisation de la 3-OST2 avec celle des syndécans. Contrairement à la 3-OST3A, nous n'avons pas observé de co-localisation avec le syndécan-4, ce qui confirme le fait que les deux isoenzymes ne soient pas localisées au sein des mêmes régions. En revanche, le marquage membranaire de la 3-OST2 est superposable à celui du syndécan-2, suggérant une co-localisation entre les deux molécules à la surface cellulaire. De plus, l'invalidation de l'expression de ce protéoglycane entraîne la perte du marquage membranaire associé à la 3-OST2 au profit d'une accumulation de l'enzyme au sein d'organites intracellulaires. Ces résultats suggèrent que le syndécan-2 est nécessaire pour l'adressage de la 3-OST2 vers la membrane

plasmique. Etant donné que le trafic intracellulaire de la 3-OST2 est dépendant de la présence de son domaine catalytique, il est possible que l'enzyme soit entraînée par le syndécan-2. En effet, le protéoglycane pourrait prendre en charge la 3-OST2 par interaction avec ses chaînes HS et l'acheminer à partir de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Des expériences sont actuellement réalisées pour déterminer précisément les interactions entre le syndécan-2 et la 3-OST2 et identifier leur présence au sein des plaques focales d'adhésion.

Plusieurs études ont utilisé des systèmes de surexpression pour démontrer une localisation golgienne des enzymes de biosynthèse des HS, telles que EXT1, EXT2, la C5-épimérase, la 2-OST ou encore les 6-OSTs (McCornick *et al.*, 2000; Pinhal *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2004). Dans ce contexte, l'adressage de la 3-OST2 à partir de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique est surprenant. Toutefois, cette localisation non conventionnelle pour une HS sulfotransférase pourrait être la conséquence d'un artefact dû à la surexpression en cellules HeLa. Pour écarter cette hypothèse, nous avons analysé la localisation subcellulaire de la 3-OST2 endogène dans les macrophages, puisque les travaux réalisés dans l'Equipe ont démontré sa forte expression dans ce type cellulaire (Martinez *et al.*, 2015). Nos résultats montrent que la 3-OST2 est localisée de manière similaire à la membrane plasmique, que ce soit dans les macrophages ou dans les cellules HeLa surexprimant cette isoenzyme. Ainsi, ces résultats excluent la possibilité que la localisation non conventionnelle de la 3-OST2 soit juste un artefact lié au système de surexpression. Nous avons également vérifié que la 3-OST2 est co-localisée avec le syndécan-2 au niveau de la membrane plasmique des macrophages. L'invalidation de l'expression du protéoglycane altère sa localisation membranaire, ce qui confirme l'association fonctionnelle entre les deux molécules.

En conclusion, nos résultats montrent pour la première fois que certaines 3-OSTs possèdent une localisation subcellulaire distincte, avec notamment un adressage inattendu de la 3-OST2, et dans une moindre proportion, de la 3-OST3A, vers la membrane plasmique. Comme mentionné précédemment, nous avons montré que la polarisation des macrophages entraîne de profonds changements d'expression des HS sulfotransférases. Les différences les plus marquantes entre les macrophages M1 et M2 concernent les 3-OST2 et 3-OST3B. Alors que la 3-OST2 est présente à un taux élevé dans les macrophages M2, son expression est rapidement réprimée dans les macrophages M1. A l'inverse, l'expression de la 3-OST3B est fortement induite dans les macrophages M1 (Martinez *et al.*, 2015). Ainsi, nos résultats supportent l'hypothèse selon laquelle les 3-OST2, 3A et 3B pourraient avoir des fonctions différentes dans les deux types de macrophages en relation avec leur expression différentielle combinée à leur localisation subcellulaire distincte.

Conclusion Générale

Les HS sont retrouvés en abondance dans les MECs et à la surface des cellules. Ils sont formés de la répétition d'un disaccharide de base composé d'un acide uronique (GlcUA ou IdoUA) lié à un résidu de GlcN. Le groupement amine de la GlcN peut être *N*-acétylé, *N*-sulfaté ou très rarement non substitué, alors que les fonctions hydroxyles en position C3 et/ou C6 peuvent être sulfatées. Quant à l'acide uronique, il peut être sulfaté en position C2. Ces différentes modifications sont catalysées par plusieurs isoenzymes regroupées en quatre familles : les NDSTs (4 membres), la 2-OST, les 6-OSTs (3 membres) et les 3-OSTs (7 membres). Toutes ces enzymes n'agissent pas de façon systématique sur l'ensemble de la chaîne HS en cours de biosynthèse. En outre, les membres d'une même famille possèdent de fines différences d'activité et de spécificité de substrat. Un degré de complexité supplémentaire est ajouté du fait que ces isoenzymes sont exprimées à des niveaux variables selon le type cellulaire et le microenvironnement. Il en résulte une organisation très hétérogène des chaînes HS, où alternent des motifs structuraux fortement modifiés dénommés domaines NS, des domaines NA peu ou non modifiés, et des zones de sulfatation intermédiaire NA/NS. En raison de leur large diversité structurale, les HS sont capables d'interagir avec de nombreux ligands protéiques, incluant des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines et des composants de la MEC. *Via* ces interactions, ils participent à la modulation d'un grand nombre de processus physiologiques ou pathologiques.

Les 3-OSTs représentent la famille de HS sulfotransférases comptant le plus de membres, et pourtant, la 3-*O*-sulfatation est la modification la plus rare des HS. En outre, plusieurs études suggèrent un rôle important de ces enzymes dans de nombreux processus physiopathologiques, mais à l'heure actuelle, peu de travaux ont décrit une interaction fonctionnelle entre les HS 3-*O*-sulfatés et des ligands protéiques (Thacker *et al.*, 2014). Par exemple, des études ont démontré l'implication des HS 3-*O*-sulfatés dans la fixation de la protéine gD du virus HSV-1. A l'exception de la 3-OST1, tous les autres membres de la famille des 3-OSTs sont capables de générer le motif HS spécifique de la protéine virale. Cette interaction est nécessaire à la fusion membranaire entre le virus et certaines cellules cibles, et représente donc une étape cruciale dans le processus infectieux. La protéine gD intervient également dans d'autres processus favorables à la survie du virus dans les cellules infectées. Ainsi, il a été démontré qu'une forme soluble de la protéine gD est aussi efficace que la particule virale pour protéger les cellules myéloïdes contre l'apoptose. Un autre exemple de protéine dépendante des HS 3-*O*-sulfatés est la CyPB. Comme pour la protéine gD, les interactions avec les HS 3-*O*-sulfatés sont fonctionnels, puisqu'elles sont indispensables à l'activité pro-migratoire de la CyPB vis-à-vis des macrophages et des lymphocytes T (Vanpouille *et al.*, 2007; Deligny *et al.*, 2010).

Sur la base de ces travaux, la première partie des travaux de thèse a été consacrée à vérifier si la protéine gD et la CyPB induisaient les mêmes réponses cellulaires dans les macrophages. Pour cette étude, nous avons utilisé un modèle de macrophages primaires différenciés *in vitro* à partir de monocytes isolés de sang humain. Dans un premier temps, nous avons confirmé que la protéine gD recombinante soluble a bien un effet protecteur contre la mort induite dans les macrophages par un agent pro-apoptotique. Nous avons ensuite démontré que la CyPB possède les mêmes propriétés anti-apoptotiques vis-à-vis des macrophages. En complément des HS 3-O-sulfatés, la protéine gD peut interagir avec trois autres récepteurs membranaires, les nectines 1 et 2 et HVEM. Afin d'étudier l'importance relative de ces différents récepteurs dans les réponses anti-apoptotiques, nous avons utilisé une approche par ARN interférence. Nos résultats ont montré que les propriétés anti-apoptotiques de la protéine gD et la CyPB sont dépendantes de l'expression de la 3-OST2 dans les macrophages, ce qui a confirmé l'importance fonctionnelle des HS 3-O-sulfatés dans les activités des deux protéines. En outre, nous avons vérifié que la fixation de la protéine gD à la surface des macrophages est inhibée en présence d'un excès de CyPB, ce qui suggère que les HS 3-O-sulfatés nécessaires à la fixation des deux protéines sont probablement les mêmes. L'invalidation de HVEM réduit considérablement les réponses anti-apoptotiques induites par la protéine gD et par la CyPB dans les macrophages. A l'inverse, nous n'avons pas observé d'inhibition après invalidation d'expression de la nectine-2, indiquant que la survie induite par la protéine gD et la CyPB dans les macrophages est dépendante de HVEM et des HS 3-O-sulfatés. Si ces résultats n'étaient pas surprenants pour la protéine gD, ils étaient inattendus pour la CyPB, étant donné qu'aucune interaction entre cette protéine et HVEM n'a été reportée à ce jour. Par contre, le CD147 a déjà été décrit comme étant impliqué dans l'activité chimio-attractante de la CyPB (Yurchenko *et al.*, 2001; Allain *et al.*, 2002). Toutefois, invalider l'expression du CD147 n'a eu aucun effet sur les réponses induites par la CyPB ou la gD dans notre modèle. Dans leur ensemble, cette étude nous a permis de montrer que la protéine gD du virus HSV-1 et la CyPB partagent les mêmes propriétés anti-apoptotiques vis-à-vis des macrophages, par un mécanisme dépendant des interactions avec un complexe membranaire commun formé par HVEM et les HS 3-O-sulfatés.

Etant donné leur rôle dans les processus d'entrée du virus et de protection contre l'apoptose, les HS 3-O-sulfatés représentent une cible thérapeutique intéressante. En effet, HSV-1 peut être à l'origine de graves complications oculaires, et aucun traitement efficace n'est actuellement disponible pour lutter contre le virus. Dans ce contexte, des oligosaccharides d'héparine 3-O-sulfatés et des peptides basiques ont déjà été testés avec succès pour bloquer l'entrée du virus (Copeland *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2011). Les travaux antérieurs réalisés au Laboratoire ont permis d'identifier la région de la CyPB impliquée dans

les interactions avec les HS (Carpentier *et al.*, 1999). Si la protéine gD utilise bien les mêmes récepteurs que la CyPB, un peptide synthétique mimant le site de fixation de la CyPB sur les HS 3-O-sulfatés devrait se révéler efficace pour inhiber spécifiquement les réponses induites par la protéine gD dans les cellules ciblées par HSV-1.

Les HS jouent un rôle majeur dans les mécanismes contrôlant les réponses inflammatoires et immunitaires. Par conséquent, l'étude des variations d'expression de leurs enzymes de biosynthèse et des modifications structurales qui en découlent est nécessaire à la compréhension de leurs rôles au cours de ces processus. Les macrophages sont des acteurs majeurs dans la mise en place des réponses immunitaires innées et adaptatives. Ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur leur grande plasticité phénotypique. En présence de cytokines de type Th1 et d'agonistes des TLRs, les macrophages vont acquérir un phénotype pro-inflammatoire, dénommé M1. Par contre, dans un contexte anti-inflammatoire et/ou enrichi en cytokines de type Th2, ils sont capables de se différencier en cellules tolérantes selon un mode alternatif dénommé M2. Les travaux précédents réalisés dans l'Equipe ont montré que la polarisation des macrophages s'accompagnait de larges variations d'expression pour certaines HS sulfotransférases. Dans les macrophages M1, l'expression de la 3-OST3B est fortement induite, à l'inverse de la 3-OST2. Par contre, la polarisation M2 ne réduit le niveau d'expression d'aucune enzyme, mais induit une augmentation de l'expression de la 3-OST2 (Martinez *et al.*, 2015). A la suite de ces travaux, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la régulation de ces deux isoenzymes en réponse aux stimuli de polarisation M1.

Concernant la 3-OST3B, les mécanismes mis en jeu semblent être identiques à ceux observés dans les monocytes activés en présence de LPS (Sikora *et al.*, 2016). L'expression de la 3-OST3B en réponse au LPS serait dépendante de mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels, responsables à la fois de l'augmentation précoce du taux d'ARNm, puis de la mise en place d'une phase de stabilisation. Ce type de régulation est couramment observé pour d'autres gènes de l'immunité innée (Frevel *et al.*, 2003), ce qui suggère que le gène de la 3-OST3B se comporte comme un gène précoce de la réponse inflammatoire. Contrairement à ce qui est observé pour la 3-OST3B, la stimulation des macrophages par les stimuli pro-M1 inhibe l'expression de la 3-OST2. Des mécanismes transcriptionnels seraient également impliqués, mais nos résultats montrent qu'ils seraient différents de ceux responsables de l'induction de la 3-OST3B. En effet, l'association LPS/IFN- γ induit une diminution rapide du taux des ARNhn dans les macrophages, ce qui suggère un arrêt de la transcription du gène *Hs3st2*. Le ou les facteurs responsables restent encore à déterminer. En complément, nos résultats préliminaires suggèrent que la forte diminution du taux de transcrits de la 3-OST2 pourrait être également liée à l'intervention de miRNA. Des études

complémentaires sont actuellement en cours afin d'identifier le ou les miRNA impliqués dans ces processus.

Dans leur ensemble, ces travaux montrent que les profonds changements observés dans l'expression des 3-OST2 et 3-OST3B lors de la polarisation M1 des macrophages sont la conséquence de la mise en place de mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels spécifiques pour chaque isoenzyme. Ainsi, l'expression différentielle des deux 3-OSTs pourrait être à l'origine de la synthèse de motifs HS 3-O-sulfatés distincts, potentiellement impliqués dans les fonctions spécifiques aux sous-types de macrophages. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de ces variations d'expression. Dans un premier temps, il sera important d'étudier les variations structurales des HS consécutives à cette expression différentielle. L'analyse de la composition en disaccharides des HS purifiés à partir des macrophages différenciés a déjà révélé des profils différents (Martinez *et al.*, 2015). Des analyses plus fines sont toutefois requises pour identifier plus précisément la nature des motifs HS 3-O-sulfatés. D'autre part, les HS sont capables d'interagir avec de nombreux ligands protéiques, incluant des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines et des composants de la MEC. *Via* ces interactions, ils régulent de nombreux processus cellulaires et jouent un rôle important dans la communication intercellulaire au sein des tissus. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de l'expression différentielle des 3-OSTs sur la communication entre les deux types de macrophages et leur micro-environnement. Ces travaux devraient nous permettre de mieux comprendre le rôle physiologique de la 3-O-sulfatation, ainsi que les conséquences de son dérèglement dans un contexte pathologique.

Ces dernières années, il a été proposé que la biosynthèse des chaînes HS puisse être régulée par la capacité des différentes enzymes impliquées à s'associer au sein de complexes macromoléculaires appelés « GAGosomes » (Esko and Selleck, 2002 ; Lindhal and Li, 2009). En outre, les variations d'expression de ces enzymes ainsi que leur localisation subcellulaire pourraient être à l'origine de la formation de différents GAGosomes en fonction du type cellulaire, ce qui aboutirait à la génération de chaînes HS avec des profils de substitution variés. Selon le schéma classique de biosynthèse des HS, toutes les enzymes sont considérées comme des protéines résidentes de l'appareil de Golgi. Toutefois, la place des 3-OSTs au sein de ces complexes n'a pas été établie à ce jour.

Dans ce contexte, la dernière partie de la thèse a été consacrée à la localisation subcellulaire des 3-OST2, 3A et 3B. Cette étude a été réalisée en utilisant des vecteurs d'expression codant pour des formes fluorescentes de chaque isoenzyme. Nos résultats montrent que les 3OST3A et 3-OST3B sont localisées dans l'appareil de Golgi, ce qui est en accord avec les études réalisées pour les autres enzymes de maturation des HS. En

revanche, si la 3-OST3B n'est retrouvée que dans le Golgi, la distribution subcellulaire de la 3-OST3A est plus large. Elle est également retrouvée dans des vésicules intracellulaires à l'extérieur de l'appareil de Golgi et à proximité de la membrane plasmique. Cette différence de localisation suggère une fonction spécifique de la 3-OST3A. Nous avons alors démontré que l'inactivation d'expression du syndécan-4 entraîne une diminution du trafic de la 3-OST3A à l'extérieur du Golgi, ce qui suggère une implication de ce protéoglycane dans le trafic intracellulaire de l'enzyme. Les travaux de Baietti *et al.* (2012) ont démontré que les syndécans, en association avec des protéines adaptatrices comme la synténine et ALIX, sont impliqués dans la biogenèse des exosomes. Ces vésicules sécrétées par de nombreux types cellulaires sont importantes dans les phénomènes de communication intercellulaire et jouent un rôle majeur dans la régulation de processus physiologiques et pathologiques (Columbo *et al.*, 2014). Ainsi, nos résultats suggèrent que la 3-OST3A pourrait être présente, au même titre que le syndécan-4, au sein de ces exosomes. Afin de confirmer cette hypothèse, il est tout d'abord nécessaire d'établir la présence de l'enzyme à partir d'exosomes purifiés. Il a également été démontré des modifications qualitatives et quantitatives des exosomes au cours des phénomènes de progression tumorale notamment dans le cas du cancer du pancréas (Melo *et al.*, 2015). En parallèle, les travaux récents de Mao *et al.* (2016) ont montré une augmentation de l'expression de la 3-OST3A dans des tumeurs mammaires. Dans l'hypothèse où la 3-OST3A est présente au sein des exosomes, il serait intéressant d'étudier si la 3-OST3A est également surexprimée dans des tumeurs pancréatiques, ce qui suggérerait une éventuelle corrélation entre les variations d'expression observées et le développement tumoral.

Contrairement aux deux 3-OSTs précédentes, nous avons observé une localisation inhabituelle pour la 3-OST2. En effet, cette dernière est retrouvée uniquement au niveau de la membrane plasmique, que ce soit dans les cellules HeLa surexprimant l'enzyme ou dans les macrophages primaires. De plus, l'inactivation d'expression du syndécan-2 altère fortement la localisation membranaire de la 3-OST2 dans les deux types cellulaires, ce qui démontre une association fonctionnelle entre les deux molécules.

Des travaux antérieurs sur la 3-OST2 ont montré que sa surexpression conduisait à la synthèse d'une enzyme active, puisque qu'elle est capable de générer les motifs HS de fixation pour la protéine gD du virus HSV-1 (O'Donnell *et al.*, 2006). Toutefois, sa présence au niveau de la membrane plasmique suggère qu'elle puisse avoir des fonctions spécifiques associées à sa localisation non conventionnelle. En raison de l'absence de nucléotides-sucres dans le milieu extracellulaire, il a déjà été suggéré que des formes membranaires de glycosyl-transférases pourraient être impliquées dans la formation de liaisons avec des glycanes présents à la surface des cellules voisines et/ou sur des composants de la MEC (Shur *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2014). Etant donné que la présence de PAPS n'a jamais été

décrite dans le milieu extracellulaire, une telle fonction pourrait être envisagée pour la 3-OST2, ce qui serait inédit pour une HS sulfotransférase.

Dans leur ensemble, ces derniers résultats supportent l'hypothèse selon laquelle l'expression différentielle des 3-OSTs associée à leur localisation subcellulaire différente pourrait impacter la biosynthèse des HS et conduire à la génération de motifs 3-O-sulfatés distincts. En fonction du contexte inflammatoire, ces différences structurales pourraient influencer les relations entre les macrophages et leur environnement tissulaire.

Bibliographie

- Adhikari, N., Rusch, M., Mariash, A., Li, Q., Selleck, S.B., and 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., and Karamanos, N.K. (2012). Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* 279, 1177–1197.
- de Agostini, A.I., Dong, J.-C., de Vantéry Arrighi, C., Ramus, M.-A., Dentand-Quadri, I., Thalmann, S., Ventura, P., Ibecheole, V., Monge, F., Fischer, A.-M., et al. (2008). Human follicular fluid heparan sulfate contains abundant 3-O-sulfated chains with anticoagulant activity. *J. Biol. Chem.* 283, 28115–28124.
- Ahmed, M., Lock, M., Miller, C.G., and Fraser, N.W. (2002). Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J. Virol.* 76, 717–729.
- Ai, X., Do, A.-T., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., and 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.
- Ai, X., Kitazawa, T., Do, A.-T., Kusche-Gullberg, M., Labosky, P.A., and Emerson, C.P. (2007). SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation. *Development* 134, 3327–3338.
- Aikawa, J., Grobe, K., Tsujimoto, M., and 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.
- Akhtar, J., and Shukla, D. (2009). Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 276, 7228–7236.
- Allain, F., Vanpouille, C., Carpentier, M., Slomianny, M.-C., Durieux, S., and Spik, G. (2002). Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2714–2719.
- Axelsson, J., Xu, D., Kang, B.N., Nussbacher, J.K., Handel, T.M., Ley, K., Sriramarao, P., and Esko, J.D. (2012). Inactivation of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase accentuates neutrophil infiltration during acute inflammation in mice. *Blood* 120, 1742–1751.
- Backen, A.C., Cole, C.L., Lau, S.C., Clamp, A.R., McVey, R., Gallagher, J.T., and Jayson, G.C. (2007). Heparan sulphate synthetic and editing enzymes in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 96, 1544–1548.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., et al. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 677–685.
- Banfield, D.K. (2011). Mechanisms of protein retention in the Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a005264.
- Bao, L., Yan, Y., Xu, C., Ji, W., Shen, S., Xu, G., Zeng, Y., Sun, B., Qian, H., Chen, L., et al. (2013). MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways. *Cancer Lett.* 337,

- Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H.B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* *33*, 7138–7150.
- Bart, G., Vico, N.O., Hassinen, A., Pujol, F.M., Deen, A.J., Ruusala, A., Tammi, R.H., Squire, A., Heldin, P., Kellokumpu, S., et al. (2015). Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) and Proximity Ligation Assays Reveal Functionally Relevant Homo- and Heteromeric Complexes among Hyaluronan Synthases HAS1, HAS2, and HAS3. *J. Biol. Chem.* *290*, 11479–11490.
- Bethea, H.N., Xu, D., Liu, J., and 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.
- Biroccio, A., Cherfils-Vicini, J., Augereau, A., Pinte, S., Bauwens, S., Ye, J., Simonet, T., Horard, B., Jamet, K., Cervera, L., et al. (2013). TRF2 inhibits a cell-extrinsic pathway through which natural killer cells eliminate cancer cells. *Nat. Cell Biol.* *15*, 818–828.
- Biswas, S.K., Chittechath, M., Shalova, I.N., and Lim, J.-Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.* *53*, 11–24.
- Brinkmann, T., Weilke, C., and Kleesiek, K. (1997). Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *J. Biol. Chem.* *272*, 11171–11175.
- Bruinsma, I.B., te Riet, L., Gevers, T., ten Dam, G.B., van Kuppevelt, T.H., David, G., Küsters, B., de Waal, R.M.W., and Verbeek, M.M. (2010). Sulfation of heparan sulfate associated with amyloid-beta plaques in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* *119*, 211–220.
- Brusilovsky, M., Cordoba, M., Rosental, B., Hershkovitz, O., Andrade, M.D., Pecherskaya, A., Einarson, M.B., Zhou, Y., Braiman, A., Campbell, K.S., et al. (2013). Genome-wide siRNA screen reveals a new cellular partner of NK cell receptor KIR2DL4: heparan sulfate directly modulates KIR2DL4-mediated responses. *J. Immunol.* *191*, 5256–5267.
- Bui, C., Ouzzine, M., Talhaoui, I., Sharp, S., Prydz, K., Coughtrie, M.W.H., and 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.
- Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S., and Wilson, V.A. (1998). Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev.* *12*, 1894–1906.
- Bülow, H.E., and Hobert, O. (2004). Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. *Neuron* *41*, 723–736.
- Bülow, H.E., Tjoe, N., Townley, R.A., Didiano, D., van Kuppevelt, T.H., and Hobert, O. (2008). Extracellular sugar modifications provide instructive and cell-specific information for axon-guidance choices. *Curr. Biol.* *18*, 1978–1985.
- Busse, M., Feta, A., Presto, J., Wilén, M., Grønning, M., Kjellén, L., and Kusche-Gullberg, M. (2007). Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J. Biol. Chem.* *282*, 32802–32810.

- Cairo, G., Recalcati, S., Mantovani, A., and Locati, M. (2011). Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol.* 32, 241–247.
- Carfi, A., Willis, S.H., Whitbeck, J.C., Krummenacher, C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Wiley, D.C. (2001). Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Bound to the Human Receptor HveA. *Molecular Cell* 8, 169–179.
- Carlson, E.C., Sun, Y., Auletta, J., Kao, W.W.-Y., Liu, C.-Y., Perez, V.L., and Pearlman, E. (2010). Regulation of corneal inflammation by neutrophil-dependent cleavage of keratan sulfate proteoglycans as a model for breakdown of the chemokine gradient. *J. Leukoc. Biol.* 88, 517–522.
- Carpentier, M., Allain, F., Haendler, B., Denys, A., Mariller, C., Benaïssa, M., and Spik, G. (1999). Two distinct regions of cyclophilin B are involved in the recognition of a functional receptor and of glycosaminoglycans on T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 10990–10998.
- Carter, N.M., Ali, S., and 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.
- Cartier, A., Komai, T., and Masucci, M.G. (2003). The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp. Cell Res.* 291, 242–250.
- Castillo, G.M., Lukito, W., Wight, T.N., and Snow, A.D. (1999). The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation. *J. Neurochem.* 72, 1681–1687.
- Cheung, W.F., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., Lindhal, U., and 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* 35, 5250–5256.
- Choudhary, S., Marquez, M., Alencastro, F., Spors, F., Zhao, Y., and Tiwari, V. (2011). Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) entry into human mesenchymal stem cells is heavily dependent on heparan sulfate. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 264350.
- Christensen, M., Larsen, L.A., Kauppinen, S., and Schratt, G. (2010). Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated microRNA Delivery into the Postnatal Mouse Brain Reveals a Role for miR-134 in Dendritogenesis in Vivo. *Front Neural Circuits* 3, 16.
- Cole, C.L., Rushton, G., Jayson, G.C., and Avizienyte, E. (2014). Ovarian cancer cell heparan sulfate 6-O-sulfotransferases regulate an angiogenic program induced by heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor/EGF receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 289, 10488–10501.
- Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289.
- Copeland, R., Balasubramaniam, A., Tiwari, V., Zhang, F., Bridges, A., Linhardt, R.J., Shukla, D., and Liu, J. (2008). Using a 3-O-sulfated heparin octasaccharide to inhibit the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochemistry* 47, 5774–5783.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by

- the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 49–63.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Manon, S., and Kinnally, K.W. (2006). Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1762*, 191–201.
- Delehedde, M., Seve, M., Sergeant, N., Wartelle, I., Lyon, M., Rudland, P.S., and Fernig, D.G. (2000). Fibroblast growth factor-2 stimulation of p42/44MAPK phosphorylation and I κ B degradation is regulated by heparan sulfate/heparin in rat mammary fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *275*, 33905–33910.
- Deligny, A., Denys, A., Marcant, A., Melchior, A., Mazurier, J., van Kuppevelt, T.H., and 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.
- Deligny, A., Dierker, T., Dagälv, A., Lundequist, A., Eriksson, I., Nairn, A.V., Moremen, K.W., Merry, C.L.R., and Kjellen, L. (2016). NDST2 (N-Deacetylase/N-Sulfotransferase-2) Regulates Heparan Sulfate Chain Length. *J. Biol. Chem.*
- Denys, A., Allain, F., Carpentier, M., and 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.
- Dewerchin, M., Héroult, J.-P., Wallays, G., Petitou, M., Schaeffer, P., Millet, L., Weitz, J.I., Moons, L., Collen, D., Carmeliet, P., et al. (2003). Life-threatening thrombosis in mice with targeted Arg48-to-Cys mutation of the heparin-binding domain of antithrombin. *Circ. Res.* *93*, 1120–1126.
- Dhoot, G.K., Gustafsson, M.K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D.M., and Emerson, C.P. (2001). Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science* *293*, 1663–1666.
- Diaz, B., and Lopez-Berestein, G. (2000). A distinct element involved in lipopolysaccharide activation of the tumor necrosis factor- α promoter in monocytes. *J. Interferon Cytokine Res.* *20*, 741–748.
- Dierker, T., Bachvarova, V., Krause, Y., Li, J.-P., Kjellén, L., Seidler, D.G., and Vortkamp, A. (2016). Altered heparan sulfate structure in *Glce*($-/-$) mice leads to increased Hedgehog signaling in endochondral bones. *Matrix Biol.* *49*, 82–92.
- Do, A.-T., Smeds, E., Spillmann, D., and 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.
- Dou, W., Xu, Y., Pagadala, V., Pedersen, L.C., and Liu, J. (2015). Role of Deacetylase Activity of N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 1 in Forming N-Sulfated Domain in Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.* *290*, 20427–20437.
- Duncan, M.B., Liu, M., Fox, C., and 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.
- Dyck, S.M., and Karimi-Abdolrezaee, S. (2015). Chondroitin sulfate proteoglycans: Key modulators in the developing and pathologic central nervous system. *Exp. Neurol.* *269*,

169–187.

- Edavettal, S.C., Carrick, K., Shah, R.R., Pedersen, L.C., Tropsha, A., Pope, R.M., and Liu, J. (2004a). A conformational change in heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-1 is induced by binding to heparan sulfate. *Biochemistry* *43*, 4680–4688.
- Edavettal, S.C., Lee, K.A., Negishi, M., Linhardt, R.J., Liu, J., and Pedersen, L.C. (2004b). Crystal structure and mutational analysis of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 1. *J. Biol. Chem.* *279*, 25789–25797.
- Esko, J.D., and Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.* *108*, 169–173.
- Esko, J.D., and Selleck, S.B. (2002). Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 435–471.
- Fang, J., Song, T., Lindahl, U., and Li, J.-P. (2016). Enzyme overexpression - an exercise toward understanding regulation of heparan sulfate biosynthesis. *Sci. Rep.* *6*, 31242.
- Faure, M., and Long, E.O. (2002). KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J. Immunol.* *168*, 6208–6214.
- Ferguson, B.W., and Datta, S. (2011). Role of heparan sulfate 2-o-sulfotransferase in prostate cancer cell proliferation, invasion, and growth factor signaling. *Prostate Cancer* *2011*, 893208.
- 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., and 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.
- Feyzi, E., Trybala, E., Bergström, T., Lindahl, U., and Spillmann, D. (1997). Structural requirement of heparan sulfate for interaction with herpes simplex virus type 1 virions and isolated glycoprotein C. *J. Biol. Chem.* *272*, 24850–24857.
- Frese, M.-A., Milz, F., Dick, M., Lamanna, W.C., and Dierks, T. (2009). Characterization of the human sulfatase Sulf1 and its high affinity heparin/heparan sulfate interaction domain. *J. Biol. Chem.* *284*, 28033–28044.
- Frevel, M.A.E., Bakheet, T., Silva, A.M., Hissong, J.G., Khabar, K.S.A., and Williams, B.R.G. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 425–436.
- Funderburgh, J.L. (2000). Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* *10*, 951–958.
- Funderburgh, J.L. (2002). Keratan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* *54*, 187–194.
- García, B., Merayo-Llodes, J., Martín, C., Alcalde, I., Quirós, L.M., and Vazquez, F. (2016). Surface Proteoglycans as Mediators in Bacterial Pathogens Infections. *Front Microbiol* *7*.
- Gasimli, L., Hickey, A.M., Yang, B., Li, G., dela Rosa, M., Nairn, A.V., Kulik, M.J., Dordick, J.S., Moremen, K.W., Dalton, S., et al. (2014). Changes in glycosaminoglycan structure on differentiation of human embryonic stem cells towards mesoderm and endoderm lineages. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 1993–2003.

- Geelhaar-Karsch, A., Schinnerling, K., Conrad, K., Friebel, J., Allers, K., Schneider, T., and Moos, V. (2013). Evaluation of arginine metabolism for the analysis of M1/M2 macrophage activation in human clinical specimens. *Inflamm. Res.* 62, 865–869.
- Ghiselli, G., and Agrawal, A. (2005). The human D-glucuronyl C5-epimerase gene is transcriptionally activated through the beta-catenin-TCF4 pathway. *Biochem. J.* 390, 493–499.
- Girardin, E.P., Hajmohammadi, S., Birmele, B., Helisch, A., Shworak, N.W., and 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.
- Grobe, K., Ledin, J., Ringvall, M., Holmborn, K., Forsberg, E., Esko, J.D., and Kjellén, L. (2002). Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 209–215.
- Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J.-C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2005). Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 280, 1417–1425.
- Guo, Y., Feng, Y., Li, Z., and Lin, X. (2014a). *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase B null mutant is viable and exhibits no defects in Notch signaling. *J Genet. Genomics* 41, 369–378.
- Guo, Y., Li, Z., and Lin, X. (2014b). Hs3st-A and Hs3st-B regulate intestinal homeostasis in *Drosophila* adult midgut. *Cell. Signal.* 26, 2317–2325.
- Habuchi, H., and Kimata, K. (2010). Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 93, 79–111.
- Habuchi, H., Habuchi, O., and 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., Tanaka, M., Habuchi, O., Yoshida, K., Suzuki, H., Ban, K., and Kimata, K. (2000). The Occurrence of Three Isoforms of Heparan Sulfate 6-O-Sulfotransferase Having Different Specificities for Hexuronic Acid Adjacent to the Targeted N-Sulfoglucosamine. *J. Biol. Chem.* 275, 2859–2868.
- Habuchi, H., Miyake, G., Nogami, K., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Kusche-Gullberg, M., Habuchi, O., Tanaka, M., and 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., and 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.
- Hajmohammadi, S., Enyoji, K., Princivalle, M., Christi, P., Lech, M., Beeler, D., Rayburn, H.,

- Schwartz, J.J., Barzegar, S., de Agostini, A.I., et al. (2003). Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis. *J. Clin. Invest.* *111*, 989–999.
- Hameetman, L., David, G., Yavas, A., White, S.J., Taminiau, A.H.M., Cleton-Jansen, A.-M., Hogendoorn, P.C.W., and Bovée, J.V.M.G. (2007). Decreased EXT expression and intracellular accumulation of heparan sulphate proteoglycan in osteochondromas and peripheral chondrosarcomas. *J. Pathol.* *211*, 399–409.
- Hammond, E., Khurana, A., Shridhar, V., and 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.
- Hanson, S.R., Best, M.D., and Wong, C.-H. (2004). Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *43*, 5736–5763.
- Harada, N., Okajima, K., Kushimoto, S., Isobe, H., and Tanaka, K. (1999). Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. *Blood* *93*, 157–164.
- Hasan, S., Hosseini, G., Princivalle, M., Dong, J.-C., Birsan, D., Cagide, C., and de Agostini, A.I. (2002). Coordinate expression of anticoagulant heparan sulfate proteoglycans and serine protease inhibitors in the rat ovary: a potent system of proteolysis control. *Biol. Reprod.* *66*, 144–158.
- Hatabe, S., Kimura, H., Arao, T., Kato, H., Hayashi, H., Nagai, T., Matsumoto, K., DE Velasco, M., Fujita, Y., Yamanouchi, G., et al. (2013). Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-2 in colorectal cancer. *Mol. Clin. Oncol.* *1*, 845–850.
- Hayashida, A., Amano, S., Gallo, R.L., Linhardt, R.J., Liu, J., and Park, P.W. (2015). 2-O-Sulfated Domains in Syndecan-1 Heparan Sulfate Inhibit Neutrophil Cathelicidin and Promote Staphylococcus aureus Corneal Infection. *J. Biol. Chem.* *290*, 16157–16167.
- He, D.-X., Gu, X.-T., Li, Y.-R., Jiang, L., Jin, J., and Ma, X. (2014). Methylation-regulated miR-149 modulates chemoresistance by targeting GlcNAc N-deacetylase/N-sulfotransferase-1 in human breast cancer. *FEBS J.* *281*, 4718–4730.
- Henderson, G., Peng, W., Jin, L., Perng, G.-C., Nesburn, A.B., Wechsler, S.L., and Jones, C. (2002). Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript. *J. Neurovirol.* *8 Suppl 2*, 103–111.
- Hirano, K., Sasaki, N., Ichimiya, T., Miura, T., Van Kuppevelt, T.H., and Nishihara, S. (2012). 3-O-sulfated heparan sulfate recognized by the antibody HS4C3 contributes [corrected] to the differentiation of mouse embryonic stem cells via fas signaling. *PLoS ONE* *7*, e43440.
- Hirano, K., Van Kuppevelt, T.H., and Nishihara, S. (2013). The transition of mouse pluripotent stem cells from the naïve to the primed state requires Fas signaling through 3-O sulfated heparan sulfate structures recognized by the HS4C3 antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *430*, 1175–1181.
- Hoffman, J.N., and Faist, E. (2000). Coagulation inhibitor replacement during sepsis: useless? *Crit. Care Med.* *28*, S74-76.

- Holmborn, K., Ledin, J., Smeds, E., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., and 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.
- Holst, C.R., Bou-Reslan, H., Gore, B.B., Wong, K., Grant, D., Chalasani, S., Carano, R.A., Frantz, G.D., Tessier-Lavigne, M., Bolon, B., et al. (2007). Secreted sulfatases Sulf1 and Sulf2 have overlapping yet essential roles in mouse neonatal survival. *PLoS ONE* 2, e575.
- Höök, M., Lindahl, U., Hallén, A., and Bäckström, G. (1975). Biosynthesis of heparin. Studies on the microsomal sulfation process. *J. Biol. Chem.* 250, 6065–6071.
- Hosseini, G., Liu, J., and de Agostini, A.I. (1996). Characterization and hormonal modulation of anticoagulant heparan sulfate proteoglycans synthesized by rat ovarian granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 271, 22090–22099.
- Huynh, M.B., Villares, J., Díaz, J.E.S., Christiaans, S., Carpentier, G., Ouidja, M.O., Sissoeff, L., Raisman-Vozari, R., and Papy-Garcia, D. (2012). Glycosaminoglycans from aged human hippocampus have altered capacities to regulate trophic factors activities but not A β 42 peptide toxicity. *Neurobiol. Aging* 33, 1005.e11–22.
- Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 42, 11–55.
- Irie, A., Habuchi, H., Kimata, K., and Sanai, Y. (2003). Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 858–865.
- Ishii, M., Wen, H., Corsa, C.A.S., Liu, T., Coelho, A.L., Allen, R.M., Carson, W.F., Cavassani, K.A., Li, X., Lukacs, N.W., et al. (2009). Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood* 114, 3244–3254.
- Isobe, H., Okajima, K., Uchiba, M., Harada, N., and Okabe, H. (2002). Antithrombin prevents endotoxin-induced hypotension by inhibiting the induction of nitric oxide synthase in rats. *Blood* 99, 1638–1645.
- Ivashkiv, L.B. (2013). Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol.* 34, 216–223.
- Jennes, I., Zuntini, M., Mees, K., Palagani, A., Pedrini, E., De Cock, G., Fransen, E., Vanden Berghe, W., Sangiorgi, L., and Wuyts, W. (2012). Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region. *Gene* 492, 148–159.
- Jerome, K.R., Chen, Z., Lang, R., Torres, M.R., Hofmeister, J., Smith, S., Fox, R., Froelich, C.J., and Corey, L. (2001). HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J. Immunol.* 167, 3928–3935.
- Kakuta, Y., Sueyoshi, T., Negishi, M., and Pedersen, L.C. (1999). Crystal Structure of the Sulfotransferase Domain of Human Heparan Sulfate N-Deacetylase/ N-Sulfotransferase 1. *J. Biol. Chem.* 274, 10673–10676.
- Kamimura, K., Rhodes, J.M., Ueda, R., McNeely, M., Shukla, D., Kimata, K., Spear, P.G., Shworak, N.W., and Nakato, H. (2004). Regulation of Notch signaling by Drosophila heparan sulfate 3-O sulfotransferase. *J Cell Biol* 166, 1069–1079.
- Karasneh, G.A., and Shukla, D. (2011). Herpes simplex virus infects most cell types in vitro:

- clues to its success. *Viol. J.* **8**, 481.
- Kasza, Z., Fredlund Fuchs, P., Tamm, C., Eriksson, A.S., O'Callaghan, P., Heindryckx, F., Spillmann, D., Larsson, E., Le Jan, S., Eriksson, I., et al. (2013). MicroRNA-24 suppression of N-deacetylase/N-sulfotransferase-1 (NDST1) reduces endothelial cell responsiveness to vascular endothelial growth factor A (VEGFA). *J. Biol. Chem.* **288**, 25956–25963.
- Katta, K., Imran, T., Busse-Wicher, M., Grønning, M., Czajkowski, S., and Kusche-Gullberg, M. (2015). Reduced Expression of EXTL2, a Member of the Exostosin (EXT) Family of Glycosyltransferases, in Human Embryonic Kidney 293 Cells Results in Longer Heparan Sulfate Chains. *J. Biol. Chem.* **290**, 13168–13177.
- Kaye, S., and Choudhary, A. (2006). Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* **25**, 355–380.
- Khurana, A., Liu, P., Mellone, P., Lorenzon, L., Vincenzi, B., Datta, K., Yang, B., Linhardt, R.J., Lingle, W., Chien, J., et al. (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., and Sugahara, K. (2001). Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode α 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**, 7176–7181.
- Kinnunen, T.K. (2014). Combinatorial roles of heparan sulfate proteoglycans and heparan sulfates in *Caenorhabditis elegans* neural development. *PLoS ONE* **9**, e102919.
- Kitagawa, H., Shimakawa, H., and Sugahara, K. (1999). The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an α 1, 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.
- Klein, N.J., Shennan, G.I., Heyderman, R.S., and 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.
- Kobayashi, E.H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., et al. (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.* **7**, 11624.
- Kobayashi, S., Morimoto, K., Shimizu, T., Takahashi, M., Kurosawa, H., and Shirasawa, T. (2000). Association of EXT1 and EXT2, hereditary multiple exostoses gene products, in Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 860–867.
- Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J.-I., and Kitagawa, H. (2009). FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region. *Biochem. J.* **421**, 157–162.
- Koike, T., Izumikawa, T., Sato, B., and Kitagawa, H. (2014). Identification of phosphatase that dephosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **289**, 6695–6708.
- Kopp, S.J., Banisadr, G., Glajch, K., Maurer, U.E., Grünwald, K., Miller, R.J., Osten, P., and

- Spear, P.G. (2009). Infection of neurons and encephalitis after intracranial inoculation of herpes simplex virus requires the entry receptor nectin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 17916–17920.
- Krenn, E.C., Wille, I., Gesslbauer, B., Poteser, M., van Kuppevelt, T.H., and Kungl, A.J. (2008). Glycanogenomics: a qPCR-approach to investigate biological glycan function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *375*, 297–302.
- 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., and Merry, C.L.R. (2006). Heparan sulfate 6-O-endosulfatases: discrete in vivo activities and functional co-operativity. *Biochem. J.* *400*, 63–73.
- Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D.B., Zucchini, S., Manservigi, R., and Glorioso, J.C. (1998). Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J. Virol.* *72*, 6119–6130.
- Lavrik, I.N., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* *115*, 2665–2672.
- Lawrence, R., Yabe, T., Hajmohammadi, S., Rhodes, J., McNeely, M., Liu, J., Lamperti, E.D., Toselli, P.A., Lech, M., Spear, P.G., et al. (2007). The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues. *Matrix Biol.* *26*, 442–455.
- Ledin, J., Staatz, W., Li, J.-P., Götte, M., Selleck, S., Kjellén, L., and Spillmann, D. (2004). Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J. Biol. Chem.* *279*, 42732–42741.
- Lee, J.Y., and Spicer, A.P. (2000). Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 581–586.
- Li, J. (2010). Glucuronyl C5-epimerase an enzyme converting glucuronic acid to iduronic acid in heparan sulfate/heparin biosynthesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* *93*, 59–78.
- Li, J., Fang, J., Qin, Y., Liao, W., Liu, H., Zhou, Y., and Ding, K. (2014). GLCE regulates PC12 cell neuritogenesis induced by nerve growth factor through activating SMAD/ID3 signalling. *Biochem. J.* *459*, 405–415.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479–489.
- Lidholt, K., Kjellén, L., and Lindahl, U. (1989). Biosynthesis of heparin. Relationship between the polymerization and sulphation processes. *Biochem. J.* *261*, 999–1007.
- Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U., and 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.
- Lindahl, U., and Li, J. (2009). Interactions between heparan sulfate and proteins-design and functional implications. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* *276*, 105–159.
- Liu, G., and Abraham, E. (2013a). MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 170–177.

- Liu, G., and Abraham, E. (2013b). MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 170–177.
- Liu, J., Shriver, Z., Blaiklock, P., Yoshida, K., Sasisekharan, R., and Rosenberg, R.D. (1999a). Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues. *J. Biol. Chem.* 274, 38155–38162.
- Liu, J., Shworak, N.W., Sinay, P., Schwartz, J.J., Zhang, L., Fritze, L.M., and Rosenberg, R.D. (1999b). Expression of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase isoforms reveals novel substrate specificities. *J. Biol. Chem.* 274, 5185–5192.
- Lombaert, I.M.A., Abrams, S.R., Li, L., Eswarakumar, V.P., Sethi, A.J., Witt, R.L., and Hoffman, M.P. (2013). Combined KIT and FGFR2b signaling regulates epithelial progenitor expansion during organogenesis. *Stem Cell Reports* 1, 604–619.
- Lu, J., Auduong, L., White, E.S., and Yue, X. (2014). Up-regulation of heparan sulfate 6-O-sulfation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50, 106–114.
- Lum, D.H., Tan, J., Rosen, S.D., and Werb, Z. (2007). Gene trap disruption of the mouse heparan sulfate 6-O-endosulfatase gene, *Sulf2*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 678–688.
- MacLeod, I.J., and Minson, T. (2010). Binding of herpes simplex virus type-1 virions leads to the induction of intracellular signalling in the absence of virus entry. *PLoS ONE* 5, e9560.
- Malmström, A., Bartolini, B., Thelin, M.A., Pacheco, B., and Maccarana, M. (2012). Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate: biosynthesis and biological function. *J. Histochem. Cytochem.* 60, 916–925.
- Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 231–237.
- Mao, X., Gauche, C., Coughtrie, M.W.H., Bui, C., Gulberti, S., Merhi-Soussi, F., Ramalanjaona, N., Bertin-Jung, I., Diot, A., Dumas, D., et al. (2016). The heparan sulfate sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A) is a novel tumor regulator and a prognostic marker in breast cancer. *Oncogene.* 35, 5043-5045
- 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.
- Mariller, C., Haendler, B., Allain, F., Denys, A., and Spik, G. (1996). Involvement of the N-terminal part of cyclophilin B in the interaction with specific Jurkat T-cell binding sites. *Biochem. J.* 317 (Pt 2), 571–576.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 177, 7303–7311.
- Martinez, P., Denys, A., Delos, M., Sikora, A.-S., Carpentier, M., Julien, S., Pestel, J., and Allain, F. (2015). Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* 25, 502–513.
- McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K.T., and 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.
- Medici, M.A., Sciortino, M.T., Perri, D., Amici, C., Avitabile, E., Ciotti, M., Balestrieri, E., De Smaele, E., Franzoso, G., and Mastino, A. (2003). Protection by herpes simplex virus glycoprotein D against Fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.* 278, 36059–36067.
- Melchior, A., Denys, A., Deligny, A., Mazurier, J., and Allain, F. (2008). Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C-delta and p44/42 mitogen-activated protein kinases. *Exp. Cell Res.* 314, 616–628.
- Melo, S.A., Luecke, L.B., Kahlert, C., Fernandez, A.F., Gammon, S.T., Kaye, J., LeBleu, V.S., Mittendorf, E.A., Weitz, J., Rahbari, N., et al. (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523, 177–182.
- Meyer, K., Linker, A., Davidson, E.A., and Weissmann, B. (1953). The mucopolysaccharides of bovine cornea. *J. Biol. Chem.* 205, 611–616.
- Meyer, K., Palmer J.W. (1934). The polysaccharides of vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 107, 629–634.
- Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 4719–4733.
- Minnema, M.C., Peters, R.J., de Winter, R., Lubbers, Y.P., Barzegar, S., Bauer, K.A., Rosenberg, R.D., Hack, C.E., and ten Cate, H. (2000). Activation of clotting factors XI and IX in patients with acute myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2489–2493.
- Miyamoto, K., Asada, K., Fukutomi, T., Okochi, E., Yagi, Y., Hasegawa, T., Asahara, T., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2003). Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* 22, 274–280.
- Mochizuki, H., Yoshida, K., Gotoh, M., Sugioka, S., Kikuchi, N., Kwon, Y.-D., Tawada, A., Maeyama, K., Inaba, N., Hiruma, T., et al. (2003). Characterization of a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-5, an enzyme synthesizing a tetrasulfated disaccharide. *J. Biol. Chem.* 278, 26780–26787.
- Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y., and Kimata, K. (2008). Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate: enzymatic formation and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 283, 31237–31245.
- Molawi, K., and Sieweke, M.H. (2013). Transcriptional control of macrophage identity, self-renewal, and function. *Adv. Immunol.* 120, 269–300.
- Moon, A.F., Edavettal, S.C., Krahn, J.M., Munoz, E.M., Negishi, M., Linhardt, R.J., Liu, J., and Pedersen, L.C. (2004). Structural analysis of the sulfotransferase (3-o-sulfotransferase isoform 3) involved in the biosynthesis of an entry receptor for herpes simplex virus 1. *J. Biol. Chem.* 279, 45185–45193.
- Morii, E., Ogihara, H., Oboki, K., Sawa, C., Sakuma, T., Nomura, S., Esko, J.D., Handa, H., and Kitamura, Y. (2001). Inhibitory effect of the mi transcription factor encoded by the mutant mi allele on GA binding protein-mediated transcript expression in mouse mast

- cells. *Blood* 97, 3032–3039.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S., and Rosen, S.D. (2002). Cloning and Characterization of Two Extracellular Heparin-degrading Endosulfatases in Mice and Humans. *J. Biol. Chem.* 277, 49175–49185.
- Mosca, M., Polentarutti, N., Mangano, G., Apicella, C., Doni, A., Mancini, F., De Bortoli, M., Coletta, I., Polenzani, L., Santoni, G., et al. (2007). Regulation of the microsomal prostaglandin E synthase-1 in polarized mononuclear phagocytes and its constitutive expression in neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 82, 320–326.
- Mostovich, L.A., Prudnikova, T.Y., Kondratov, A.G., Gubanova, N.V., Kharchenko, O.A., Kutsenko, O.S., Vavilov, P.V., Haraldson, K., Kashuba, V.I., Ernberg, I., et al. (2012). The TCF4/ β -catenin pathway and chromatin structure cooperate to regulate D-glucuronyl C5-epimerase expression in breast cancer. *Epigenetics* 7, 930–939.
- Mullican, S.E., Gaddis, C.A., Alenghat, T., Nair, M.G., Giacomini, P.R., Everett, L.J., Feng, D., Steger, D.J., Schug, J., Artis, D., et al. (2011). Histone deacetylase 3 is an epigenomic brake in macrophage alternative activation. *Genes Dev.* 25, 2480–2488.
- Munger, J., and Roizman, B. (2001). The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10410–10415.
- Murata, Y., Shimamura, T., Tagami, T., Takatsuki, F., and Hamuro, J. (2002). The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. *Int. Immunopharmacol.* 2, 673–689.
- Murphy, K.M., Nelson, C.A., and Sedý, J.R. (2006). Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 671–681.
- Musso, N., Caronia, F.P., Castorina, S., Lo Monte, A.I., Barresi, V., and Condorelli, D.F. (2015). Somatic loss of an EXT2 gene mutation during malignant progression in a patient with hereditary multiple osteochondromas. *Cancer Genet.* 208, 62–67.
- Nadanaka, S., Fujita, M., and 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.
- Nadanaka, S., Zhou, S., Kagiya, S., Shoji, N., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., and Kitagawa, H. (2013). EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 288, 9321–9333.
- Nagai, N., Habuchi, H., Esko, J.D., and Kimata, K. (2004). Stem domains of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase are required for Golgi localization, oligomer formation and enzyme activity. *J. Cell. Sci.* 117, 3331–3341.
- Nagai, N., Habuchi, H., Kitazume, S., Toyoda, H., Hashimoto, Y., and 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., and 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., Wismans, R.G.P., et al. (2012). Organ-specific sulfation patterns of heparan sulfate generated by extracellular sulfatases Sulf1 and Sulf2 in mice. *J. Biol. Chem.* **287**, 9579–9590.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by Death Factor. *Cell* **88**, 355–365.
- Neininger, A., Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Winzen, R., Eckert, R., Volk, H.-D., Holtmann, H., Kollias, G., and Gaestel, M. (2002). MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* **277**, 3065–3068.
- Neugebauer, J.M., Amack, J.D., Peterson, A.G., Bisgrove, B.W., and Yost, H.J. (2009). FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature* **458**, 651–654.
- Neugebauer, J.M., Cadwallader, A.B., Amack, J.D., Bisgrove, B.W., and Yost, H.J. (2013). Differential roles for 3-OSTs in the regulation of cilia length and motility. *Development* **140**, 3892–3902.
- Nguyen, T.K.N., Arungundram, S., Tran, V.M., Raman, K., Al-Mafraji, K., Venot, A., Boons, G.-J., and Kuberan, B. (2012). A synthetic heparan sulfate oligosaccharide library reveals the novel enzymatic action of D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3a. *Mol. Biosyst.* **8**, 609–614.
- Nusgens, B.-V. (2010). [Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?]. *Ann Dermatol Venereol* **137 Suppl 1**, S3-8.
- Odegaard, J.I., and Chawla, A. (2011). Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol* **6**, 275–297.
- O'Donnell, C.D., Tiwari, V., Oh, M.-J., and Shukla, D. (2006). A role for heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread. *Virology* **346**, 452–459.
- O'Donnell, C.D., Kovacs, M., Akhtar, J., Valyi-Nagy, T., and Shukla, D. (2010). Expanding the role of 3-O sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus type-1 entry. *Virology* **397**, 389–398.
- Oelschläger, C., Römisch, J., Staubitz, A., Stauss, H., Leithäuser, B., Tillmanns, H., and Hölschermann, H. (2002). Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood* **99**, 4015–4020.
- Olson, S.T., Björk, I., and Bock, S.C. (2002). Identification of critical molecular interactions mediating heparin activation of antithrombin: implications for the design of improved heparin anticoagulants. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 198–205.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609–619.
- Pakula, R., Melchior, A., Denys, A., Vanpouille, C., Mazurier, J., and Allain, F. (2007). Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and

- chemotaxis. *Glycobiology* 17, 492–503.
- Palanisamy, V., Jakymiw, A., Van Tubergen, E.A., D’Silva, N.J., and Kirkwood, K.L. (2012). Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs. *J. Dent. Res.* 91, 651–658.
- Pallerla, S.R., Lawrence, R., Lewejohann, L., Pan, Y., Fischer, T., Schlomann, U., Zhang, X., Esko, J.D., and Grobe, K. (2008). Altered heparan sulfate structure in mice with deleted NDST3 gene function. *J. Biol. Chem.* 283, 16885–16894.
- Patel, V.N., Likar, K.M., Zisman-Rozen, S., Cowherd, S.N., Lassiter, K.S., Sher, I., Yates, E.A., Turnbull, J.E., Ron, D., and Hoffman, M.P. (2008). Specific heparan sulfate structures modulate FGF10-mediated submandibular gland epithelial morphogenesis and differentiation. *J. Biol. Chem.* 283, 9308–9317.
- Patel, V.N., Lombaert, I.M.A., Cowherd, S.N., Shworak, N.W., Xu, Y., Liu, J., and Hoffman, M.P. (2014). Hs3st3-modified heparan sulfate controls KIT⁺ progenitor expansion by regulating 3-O-sulfotransferases. *Dev Cell* 29, 662–673.
- Pedersen, L.C., Dong, J., Taniguchi, F., Kitagawa, H., Krahn, J.M., Pedersen, L.G., Sugahara, K., and 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.
- Phillips, J.J., Huillard, E., Robinson, A.E., Ward, A., Lum, D.H., Polley, M.-Y., Rosen, S.D., Rowitch, D.H., and Werb, Z. (2012). Heparan sulfate sulfatase SULF2 regulates PDGFR α signaling and growth in human and mouse malignant glioma. *J. Clin. Invest* 122, 911–922.
- Pikas, D.S., Eriksson, I., and Kjellén, L. (2000). Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns. *Biochemistry* 39, 4552–4558.
- Pinhal, M.A., Smith, B., Olson, S., Aikawa, J., Kimata, K., and 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.
- Pomin, V.H. (2015). Keratan sulfate: an up-to-date review. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 282–289.
- Préchoux, A., Halimi, C., Simorre, J.-P., Lortat-Jacob, H., and Laguri, C. (2015). C5-epimerase and 2-O-sulfotransferase associate in vitro to generate contiguous epimerized and 2-O-sulfated heparan sulfate domains. *ACS Chem. Biol.* 10, 1064–1071.
- Presto, J., Thuveson, M., Carlsson, P., Busse, M., Wilén, M., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (2008). Heparan sulfate biosynthesis enzymes EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4751–4756.
- Princivalle, M., Hasan, S., Hosseini, G., and de Agostini, A.I. (2001). Anticoagulant heparan sulfate proteoglycans expression in the rat ovary peaks in preovulatory granulosa cells. *Glycobiology* 11, 183–194.
- 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., et al. (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.
- Prudnikova, T.Y., Mostovich, L.A., Kashuba, V.I., Ernberg, I., Zabarovsky, E.R., and Grigorieva, E.V. (2012). miRNA-218 contributes to the regulation of D-glucuronyl C5-epimerase expression in normal and tumor breast tissues. *Epigenetics* *7*, 1109–1114.
- Puré, E., and Assoian, R.K. (2009). Rheostatic signaling by CD44 and hyaluronan. *Cell. Signal.* *21*, 651–655.
- Qin, Y., Ke, J., Gu, X., Fang, J., Wang, W., Cong, Q., Li, J., Tan, J., Brunzelle, J.S., Zhang, C., et al. (2015). Structural and functional study of D-glucuronyl C5-epimerase. *J. Biol. Chem.* *290*, 4620–4630.
- Qu, X., Carbe, C., Tao, C., Powers, A., Lawrence, R., van Kuppevelt, T.H., Cardoso, W.V., Grobe, K., Esko, J.D., and Zhang, X. (2011). Lacrimal gland development and Fgf10-Fgfr2b signaling are controlled by 2-O- and 6-O-sulfated heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *286*, 14435–14444.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* *23*, 4878–4884.
- Quantock, A.J., Young, R.D., and Akama, T.O. (2010). Structural and biochemical aspects of keratan sulphate in the cornea. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 891–906.
- Ringvall, M., and 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., and Forsberg, E. (2000). Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. *J. Biol. Chem.* *275*, 25926–25930.
- Rodríguez-Prados, J.-C., Través, P.G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M., and Boscá, L. (2010). Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J. Immunol.* *185*, 605–614.
- Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U., and 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., and Kusche-Gullberg, M. (2001). Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase. *Biochemistry* *40*, 5548–5555.
- Samson, S.C., Ferrer, T., Jou, C.J., Sachse, F.B., Shankaran, S.S., Shaw, R.M., Chi, N.C., Tristani-Firouzi, M., and Yost, H.J. (2013). 3-OST-7 regulates BMP-dependent cardiac contraction. *PLoS Biol.* *11*, e1001727.
- Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G., and Narayanasami, U. (2002). Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 521–528.
- Schedin-Weiss, S., Arocas, V., Bock, S.C., Olson, S.T., and Björk, I. (2002). Specificity of the basic side chains of Lys114, Lys125, and Arg129 of antithrombin in heparin binding. *Biochemistry* *41*, 12369–12376.

- Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C. (2006). Cloning and Recombinant Expression of Active Full-length Xylosyltransferase I (XT-I) and Characterization of Subcellular Localization of XT-I and XT-II. *J. Biol. Chem.* *281*, 14224–14231.
- Schrage, Y.M., Hameetman, L., Szuhai, K., Cleton-Jansen, A.-M., Taminiau, A.H.M., Hogendoorn, P.C.W., and Bovée, J.V.M.G. (2009). Aberrant heparan sulfate proteoglycan localization, despite normal exostosin, in central chondrosarcoma. *Am. J. Pathol.* *174*, 979–988.
- Sciortino, M.T., Medici, M.A., Marino-Merlo, F., Zaccaria, D., Giuffrè-Cuculletto, M., Venuti, A., Grelli, S., Bramanti, P., and Mastino, A. (2008a). Involvement of gD/HVEM interaction in NF- κ B-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. *Biochem. Pharmacol.* *76*, 1522–1532.
- Sciortino, M.T., Medici, M.A., Marino-Merlo, F., Zaccaria, D., Giuffrè-Cuculletto, M., Venuti, A., Grelli, S., and Mastino, A. (2008b). Involvement of HVEM receptor in activation of nuclear factor kappaB by herpes simplex virus 1 glycoprotein D. *Cell. Microbiol.* *10*, 2297–2311.
- Sedita, J., Izvolsky, K., and Cardoso, W.V. (2004). Differential expression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase isoforms in the mouse embryo suggests distinctive roles during organogenesis. *Dev. Dyn.* *231*, 782–794.
- Seffouh, A., Milz, F., Przybylski, C., Laguri, C., Oosterhof, A., Bourcier, S., Sadir, R., Dutkowski, E., Daniel, R., van Kuppevelt, T.H., et al. (2013). HSulf sulfatases catalyze processive and oriented 6-O-desulfation of heparan sulfate that differentially regulates fibroblast growth factor activity. *FASEB J.* *27*, 2431–2439.
- Senay, C., Lind, T., Muguruma, K., Tone, Y., Kitagawa, H., Sugahara, K., Lidholt, K., Lindahl, U., and Kusche-Gullberg, M. (2000). The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO Rep.* *1*, 282–286.
- Sepulveda-Diaz, J.E., Alavi Naini, S.M., Huynh, M.B., Ouidja, M.O., Yanicostas, C., Chantepie, S., Villares, J., Lamari, F., Jospin, E., van Kuppevelt, T.H., et al. (2015). HS3ST2 expression is critical for the abnormal phosphorylation of tau in Alzheimer's disease-related tau pathology. *Brain* *138*, 1339–1354.
- Sheng, J., Xu, Y., Dulaney, S.B., Huang, X., and Liu, J. (2012). Uncovering biphasic catalytic mode of C5-epimerase in heparan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *287*, 20996–21002.
- Shi, X., Su, S., Long, J., Mei, B., and Chen, Y. (2011). MicroRNA-191 targets N-deacetylase/N-sulfotransferase 1 and promotes cell growth in human gastric carcinoma cell line MGC803. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* *43*, 849–856.
- Shi, X., Shao, C., Mao, Y., Huang, Y., Wu, Z.L., and Zaia, J. (2013). LC-MS and LC-MS/MS studies of incorporation of 34SO₃ into glycosaminoglycan chains by sulfotransferases. *Glycobiology* *23*, 969–979.
- Shriver, Z., Capila, I., Venkataraman, G., and 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., and Spear, P.G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan

- sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**, 13–22.
- Shukla, N.D., Tiwari, V., and Valyi-Nagy, T. (2012). Nectin-1-specific entry of herpes simplex virus 1 is sufficient for infection of the cornea and viral spread to the trigeminal ganglia. *Mol. Vis.* **18**, 2711–2716.
- Shur, B.D., Evans, S., and Lu, Q. (1998). Cell surface galactosyltransferase: current issues. *Glycoconj. J.* **15**, 537–548.
- Shworak, N.W., Liu, J., Petros, L.M., Zhang, L., Kobayashi, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Rosenberg, R.D. (1999). Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci. *J. Biol. Chem.* **274**, 5170–5184.
- Shworak, N.W., HajMohammadi, S., de Agostini, A.I., and 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., Kobayashi, T., de Agostini, A., and Smits, N.C. (2010). Anticoagulant heparan sulfate to not clot-or not? *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **93**, 153–178.
- Sikora, A.-S., Delos, M., Martinez, P., Carpentier, M., Allain, F., and Denys, A. (2016). Regulation of the Expression of Heparan Sulfate 3-O-Sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by Inflammatory Stimuli in Human Monocytes. *J. Cell. Biochem.* **117**, 1529–1542.
- Small, E.M., Sutherland, L.B., Rajagopalan, K.N., Wang, S., and Olson, E.N. (2010). MicroRNA-218 regulates vascular patterning by modulation of Slit-Robo signaling. *Circ. Res.* **107**, 1336–1344.
- Smeds, E., Habuchi, H., Do, A.-T., Hjertson, E., Grundberg, H., Kimata, K., Lindahl, U., and Kusche-Gullberg, M. (2003). Substrate specificities of mouse heparan sulphate glucosaminyl 6-O-sulphotransferases. *Biochem. J.* **372**, 371–380.
- Smeds, E., Feta, A., and Kusche-Gullberg, M. (2010). Target selection of heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase. *Glycobiology* **20**, 1274–1282.
- Song, K., Li, Q., Jiang, Z.-Z., Guo, C.-W., and 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.
- Spear, P.G. (2004). Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell. Microbiol.* **6**, 401–410.
- Spear, P.G., Shieh, M.T., Herold, B.C., WuDunn, D., and Koshy, T.I. (1992). Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **313**, 341–353.
- Squadrito, M.L., Etzrodt, M., De Palma, M., and Pittet, M.J. (2013). MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer. *Trends Immunol.* **34**, 350–359.
- Sueyoshi, T., Kakuta, Y., Pedersen, L.C., Wall, F.E., Pedersen, L.G., and 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., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., and Kitagawa, H. (2003). Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate.

- Curr. Opin. Struct. Biol. 13, 612–620.
- Sun, X., Wu, Y., Wang, Y., Xue, Q., Cheng, X., Zhang, G., Zhu, Y., and Wang, X. (2014). β -1,4-galactosyltransferase-I activates proliferation and participates in intercellular contacts of lymphocytes. *Hum. Immunol.* 75, 1019–1025.
- Sun, X.M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R., and Cohen, G.M. (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 5053–5060.
- Suzuki, M. (1939) Prosthetic group of cornea mucoid. *J. Biochem.*, 30, 185–191.
- Takahashi, I., Noguchi, N., Nata, K., Yamada, S., Kaneiwa, T., Mizumoto, S., Ikeda, T., Sugihara, K., Asano, M., Yoshikawa, T., et al. (2009). Important role of heparan sulfate in postnatal islet growth and insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383, 113–118.
- Takeda, K., Hashimoto, K., Uchikawa, R., Tegoshi, T., Yamada, M., and Arizono, N. (2010). Direct effects of IL-4/IL-13 and the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* on intestinal epithelial cells in vitro. *Parasite Immunol.* 32, 420–429.
- Tan, G.S., Chiu, C.-H., Garchow, B.G., Metzler, D., Diamond, S.L., and Kiriakidou, M. (2012). Small molecule inhibition of RISC loading. *ACS Chem. Biol.* 7, 403–410.
- Tang, R., and Rosen, S.D. (2009). Functional consequences of the subdomain organization of the sulfs. *J. Biol. Chem.* 284, 21505–21514.
- Teclé, E., Diaz-Balzac, C.A., and Bülow, H.E. (2013). Distinct 3-O-Sulfated Heparan Sulfate Modification Patterns Are Required for *kal-1*-Dependent Neurite Branching in a Context-Dependent Manner in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)* 3, 541–552.
- Thacker, B.E., Xu, D., Lawrence, R., and Esko, J.D. (2014). Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol.* 35, 60–72.
- Thacker, B.E., Seamen, E., Lawrence, R., Parker, M.W., Xu, Y., Liu, J., Vander Kooi, C.W., and Esko, J.D. (2016). Expanding the 3-O-Sulfate Proteome--Enhanced Binding of Neuropilin-1 to 3-O-Sulfated Heparan Sulfate Modulates Its Activity. *ACS Chem. Biol.* 11, 971–980.
- Tiwari, V., Clement, C., Duncan, M.B., Chen, J., Liu, J., and Shukla, D. (2004). A role for 3-O-sulfated heparan sulfate in cell fusion induced by herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 85, 805–809.
- Tiwari, V., O'Donnell, C.D., Oh, M.-J., Valyi-Nagy, T., and Shukla, D. (2005). A role for 3-O-sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 930–937.
- Tiwari, V., Clement, C., Xu, D., Valyi-Nagy, T., Yue, B.Y.J.T., Liu, J., and Shukla, D. (2006). Role for 3-O-sulfated heparan sulfate as the receptor for herpes simplex virus type 1 entry into primary human corneal fibroblasts. *J. Virol.* 80, 8970–8980.
- Tiwari, V., ten Dam, G.B., Yue, B.Y.J.T., van Kuppevelt, T.H., and Shukla, D. (2007). Role of 3-O-sulfated heparan sulfate in virus-induced polykaryocyte formation. *FEBS Lett.* 581, 4468–4472.
- Tiwari, V., Oh, M.-J., Kovacs, M., Shukla, S.Y., Valyi-Nagy, T., and Shukla, D. (2008). Role

- for nectin-1 in herpes simplex virus 1 entry and spread in human retinal pigment epithelial cells. *FEBS J.* 275, 5272–5285.
- Tiwari, V., Liu, J., Valyi-Nagy, T., and Shukla, D. (2011). Anti-heparan sulfate peptides that block herpes simplex virus infection in vivo. *J. Biol. Chem.* 286, 25406–25415.
- Tiwari, V., Maus, E., Sigar, I.M., Ramsey, K.H., and Shukla, D. (2012). Role of heparan sulfate in sexually transmitted infections. *Glycobiology* 22, 1402–1412.
- Tsai, P.-S., Chen, C.-C., Tsai, P.-S., Yang, L.-C., Huang, W.-Y., and Huang, C.-J. (2006). Heme oxygenase 1, nuclear factor E2-related factor 2, and nuclear factor kappaB are involved in hemin inhibition of type 2 cationic amino acid transporter expression and L-Arginine transport in stimulated macrophages. *Anesthesiology* 105, 1201–1210; discussion 5A.
- Tserel, L., Runnel, T., Kisand, K., Pihlap, M., Bakhoff, L., Kolde, R., Peterson, H., Vilo, J., Peterson, P., and Rebane, A. (2011). MicroRNA expression profiles of human blood monocyte-derived dendritic cells and macrophages reveal miR-511 as putative positive regulator of Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 286, 26487–26495.
- Tugal, D., Liao, X., and Jain, M.K. (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1135–1144.
- Ueno, M., Yamada, S., Zako, M., Bernfield, M., and 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.
- Ujita, M., Misra, A.K., McAuliffe, J., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (2000). Poly-N-acetylglucosamine extension in N-glycans and core 2- and core 4-branched O-glycans is differentially controlled by i-extension enzyme and different members of the beta 1,4-galactosyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* 275, 15868–15875.
- Valla, S., Li, J., Ertesvåg, H., Barbeyron, T., and 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 Heij, F., Boshuizen, M.C.S., van der Velden, S., de Boer, V.C., Reedquist, K.A., and de Winther, M.P.J. (2014). Inhibiting epigenetic enzymes to improve atherogenic macrophage functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 455, 396–402.
- Vanpouille, C., Denys, A., Carpentier, M., Pakula, R., Mazurier, J., and Allain, F. (2004). Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of cyclophilin B to heparin and cell surface heparan sulphate. *Biochem. J.* 382, 733–740.
- Vanpouille, C., Deligny, A., Delehedde, M., Denys, A., Melchior, A., Liénard, X., Lyon, M., Mazurier, J., Fernig, D.G., and 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.
- 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., et al. (2014). HS3ST2 modulates breast cancer cell invasiveness via MAP kinase- and Tcf4 (Tcf712)-dependent regulation of protease and cadherin expression. *Int. J. Cancer* 135, 2579–2592.

- Vivès, R.R., Seffouh, A., and 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., and Saunders, S. (2004). Domain-specific modification of heparan sulfate by Qsulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin. *J. Biol. Chem.* 279, 5604–5611.
- Vivier, E., and Anfossi, N. (2004). Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 190–198.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15, 2922–2933.
- Wang, S., Ai, X., Freeman, S.D., Pownall, M.E., Lu, Q., Kessler, D.S., and 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, W., Zhong, B., Sun, J., Cao, J., Tian, J., Zhong, N., Zhao, W., Tian, L., Xu, P., Guo, D., et al. (2011). Down-regulated HS6ST2 in osteoarthritis and Kashin-Beck disease inhibits cell viability and influences expression of the genes relevant to aggrecan metabolism of human chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 50, 2176–2186.
- Wei, G., Bai, X., Gabb, M.M., Bame, K.J., Koshy, T.I., Spear, P.G., and Esko, J.D. (2000). Location of the glucuronosyltransferase domain in the heparan sulfate copolymerase EXT1 by analysis of Chinese hamster ovary cell mutants. *J. Biol. Chem.* 275, 27733–27740.
- Wei, Z., Swiedler, S.J., Ishihara, M., Orellana, A., and Hirschberg, C.B. (1993). A single protein catalyzes both N-deacetylation and N-sulfation during the biosynthesis of heparan sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3885–3888.
- Weissmann, B., and Meyer, K. (1952). STRUCTURE OF HYALURONIC ACID. THE GLUCURONIDIC LINKAGE. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 4729–4729.
- Wen, J., Xiao, J., Rahdar, M., Choudhury, B.P., Cui, J., Taylor, G.S., Esko, J.D., and Dixon, J.E. (2014). Xylose phosphorylation functions as a molecular switch to regulate proteoglycan biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 15723–15728.
- Wiedermann, C.J., and Römisch, J. (2002). The anti-inflammatory actions of antithrombin--a review. *Acta Med. Austriaca* 29, 89–92.
- Wille, I., Rek, A., Krenn, E., and 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.
- Wood, M.W., Breitschwerdt, E.B., and Gookin, J.L. (2011). Autocrine Effects of Interleukin-6 Mediate Acute-Phase Proinflammatory and Tissue-Reparative Transcriptional Responses of Canine Bladder Mucosa. *Infect. Immun.* 79, 708–715.
- Xia, G., Chen, J., Tiwari, V., Ju, W., Li, J.-P., Malmstrom, A., Shukla, D., and Liu, J. (2002). Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1. *J. Biol. Chem.* 277, 37912–37919.

- Xu, D., Tiwari, V., Xia, G., Clement, C., Shukla, D., and Liu, J. (2005). Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem. J.* 385, 451–459.
- Xu, D., Song, D., Pedersen, L.C., and Liu, J. (2007). Mutational study of heparan sulfate 2-O-sulphotransferase and chondroitin sulfate 2-O-sulphotransferase. *J. Biol. Chem.* 282, 8356–8367.
- Xu, D., Moon, A.F., Song, D., Pedersen, L.C., and Liu, J. (2008). Engineering sulfotransferases to modify heparan sulfate. *Nat. Chem. Biol.* 4, 200–202.
- Yabe, T., Hata, T., He, J., and Maeda, N. (2005). Developmental and regional expression of heparan sulfate sulfotransferase genes in the mouse brain. *Glycobiology* 15, 982–993.
- Yang, G., Gong, Y., Wang, Q., Wang, Y., and Zhang, X. (2015). The role of miR-100-mediated Notch pathway in apoptosis of gastric tumor cells. *Cell. Signal.* 27, 1087–1101.
- Yoon, M., Zago, A., Shukla, D., and Spear, P.G. (2003). Mutations in the N Termini of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 gDs Alter Functional Interactions with the Entry/Fusion Receptors HVEM, Nectin-2, and 3-O-Sulfated Heparan Sulfate but Not with Nectin-1. *J Virol* 77, 9221–9231.
- Yu, X., and He, S. (2016). The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways. *Virology* 13, 77.
- Yurchenko, V., O'Connor, M., Dai, W.W., Guo, H., Toole, B., Sherry, B., and Bukrinsky, M. (2001). CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 786–788.
- Yurchenko, V., Zybarth, G., O'Connor, M., Dai, W.W., Franchin, G., Hao, T., Guo, H., Hung, H.-C., Toole, B., Gallay, P., et al. (2002). Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J. Biol. Chem.* 277, 22959–22965.
- Zhang, L. (2010). Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 93, 1–17.
- Zhang, L., Song, K., Zhou, L., Xie, Z., Zhou, P., Zhao, Y., Han, Y., Xu, X., and Li, P. (2015). Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulphotransferase-3B1 (HS3ST3B1) promotes angiogenesis and proliferation by induction of VEGF in acute myeloid leukemia cells. *J. Cell. Biochem.* 116, 1101–1112.
- Zhao, W., Liu, M., D'Silva, N.J., and Kirkwood, K.L. (2011). Tristetraprolin regulates interleukin-6 expression through p38 MAPK-dependent affinity changes with mRNA 3' untranslated region. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 629–637.

Annexes

Annexe 1

Original Article

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 Allain¹

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 du Centre National de la Recherche Scientifique-Université Lille 1, Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq F-59655, France

¹To whom correspondence should be addressed: Tel: +33-3-20-33-72-39; Fax: +33-3-20-43-65-55; e-mail: fabrice.allain@univ-lille1.fr

Received 11 June 2014; Revised 8 December 2014; Accepted 8 December 2014

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 analyzed 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 fibroblast growth factor-2 in an assay of tumor cell proliferation, thus indicating that changes in GAG structure may contribute to the functions of polarized macrophages. Altogether, our findings suggest a regulatory mechanism in which fine modifications in GAG biosynthesis may participate to the plasticity of macrophage functions.

Key words: 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 and Edwards 2008). In response to some bacterial stimuli, e.g., lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ), macrophages undergo

classic (M1) activation and produce large amounts of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines: interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-12 and tumor necrosis factor (TNF)- α . Alternative activation (M2) occurs in response to IL-4, IL-13 and other factors as IL-10, transforming growth factor- β or glucocorticoids. M2-activated macrophages express high levels of scavenger receptors, lectins (e.g., dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (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 and Martinez 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 favor 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 and Mantovani 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 and Selleck 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 and Gallo 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 glycosyltransferases, 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 (GlcNAc) residue and a glucuronic acid (GlcUA) 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 *C*₅-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), *C*₅-epimerase and 2-*O*-, 3-*O*-, 6-*O*-sulfotransferases [heparan sulfate 2-*O*-sulfotransferase (HS2ST), heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase (HS3ST) and heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferase (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 GAG 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 and Kjellén 2012). Alternatively, CS/DS chains consist of repeating disaccharide units of uronic acid and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) instead of GlcNAc. CS/DS distinction depends on the nature of the uronic acid with CS-containing GlcUA while DS contains 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 and Gallo 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

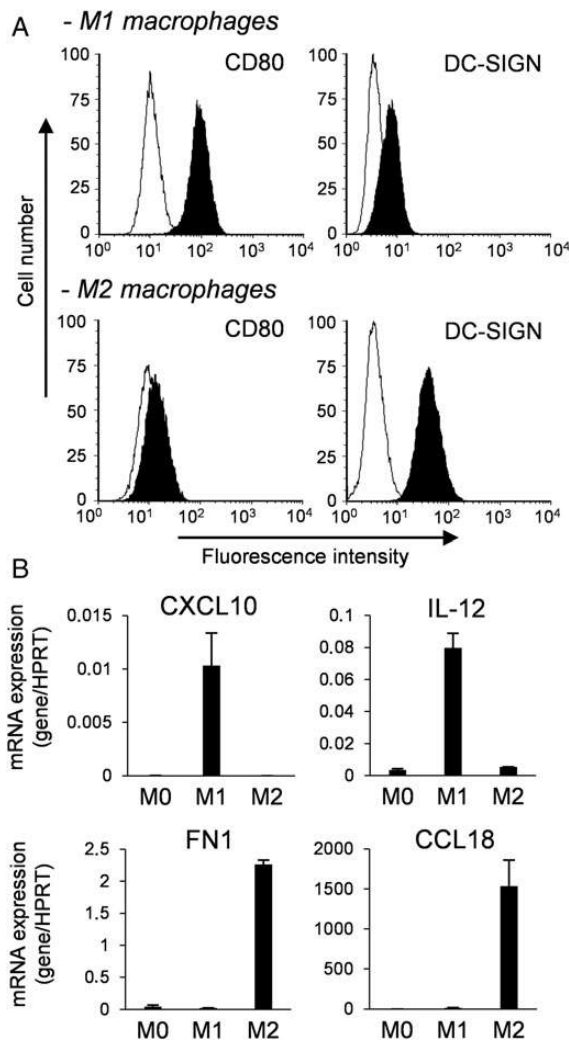


Fig. 1. Phenotypic characterization of macrophage polarization. Following activation of MDM for 2 days in the presence of either LPS/IFN- γ or IL-4/IL-13, M1 or M2 polarization was confirmed by evaluating the expression of specific phenotype markers. (A) Cell-surface expression of CD80 (M1 marker) and DC-SIGN (M2 marker) was analyzed 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 analyzed by real-time PCR, as described in Materials and methods. 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.

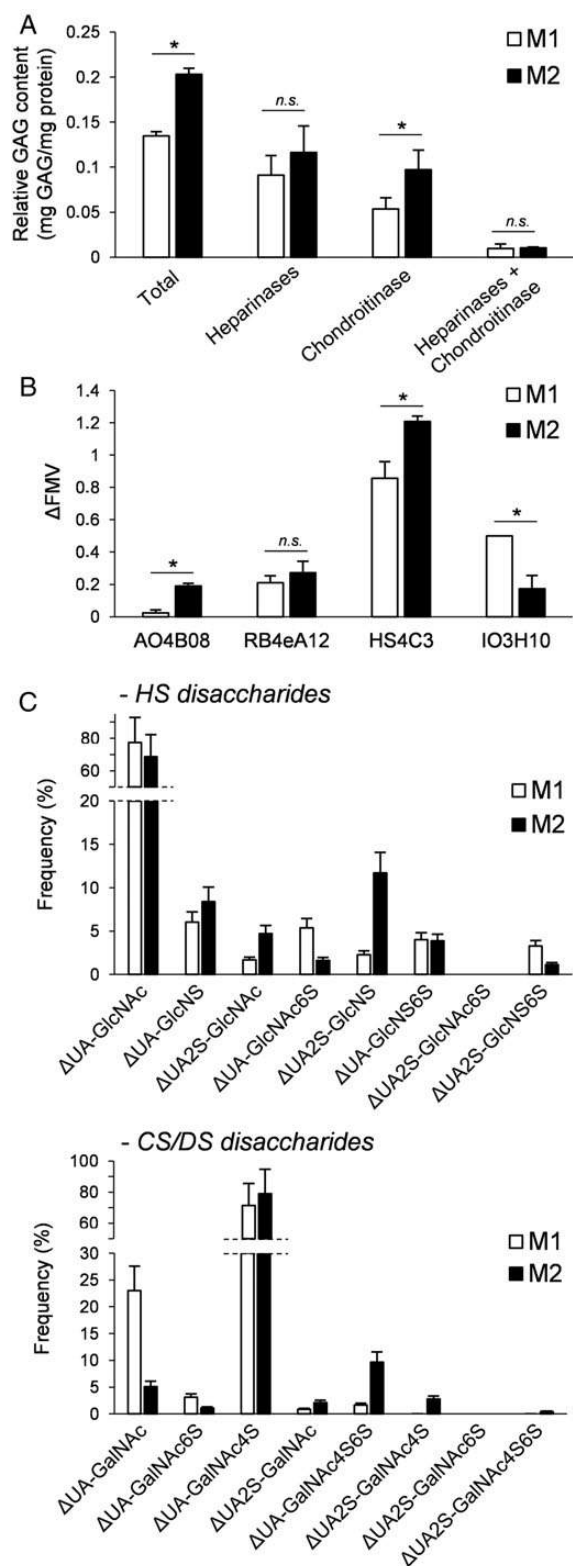


Fig. 2. Changes in GAG structural features after macrophage polarization. Following macrophage activation, the structural features of GAGs of M1 versus M2 subtypes were determined by colorimetric quantitation, cell-surface immunostaining with anti-GAG antibodies and compositional disaccharide analysis. (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).

GAG biosynthesis during macrophage polarization have not yet been studied. In the current work, we analyzed 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 GAG species to present fibroblast growth factor (FGF)-2 in an assay of tumor cell proliferation. Altogether, our findings suggest that fine modifications in the GAG biosynthesis machinery may participate to the plasticity of macrophage functions.

Results

Phenotypic characterization of M1 and M2 macrophages

Human primary monocytes-derived macrophages (MDMs) 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 upregulation 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 (Supplementary data, Figure S1). 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 GAG structural features in polarized macrophages

To examine whether macrophage polarization may affect GAG 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 GAG content was 1.5-fold lower in M1 macrophages by comparison with M2 macrophages (135 ± 4.7 versus 203 ± 6.7

GAGs were then quantified by carbazole assay, as described in Materials and methods. Relative GAG 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 and correspond to means \pm SD from at least three separate experiments obtained with macrophages from different donors (*, significant difference compared with isotype control, $P < 0.05$; n.s., not significant). (C) Compositional disaccharide analysis of GAGs from M1 and M2 macrophages. Total GAGs (5 μ g per sample) were digested with a mixture of heparinases or chondroitinase ABC. Disaccharides were labelled with AMAC and resolved by RP-HPLC (see Supplementary data, Figure S2). Data are expressed as frequency of each disaccharide and correspond to means \pm SD from two separate experiments performed with distinct donors.

µg/mg of protein, respectively). Interestingly, this difference was mainly related to an increase in HS content. Indeed, treatment with heparinases reduced the total GAG contents to 91 ± 22 µg/mg of proteins in M1 macrophages and to 116 ± 29 µg/mg of proteins in M2 macrophages. In reverse experiments, remaining GAGs after chondroitinase ABC treatment were estimated at 54 ± 12 µg versus 97 ± 22 µg/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 characterize structural features of GAGs expressed at the surface of M1 and M2 macrophages, we also analyzed the binding of a panel of anti-GAG antibodies by flow cytometry (Deligny et al. 2010). AO4B08, which preferentially reacts with HS motifs containing an internal 2-O-sulfated IdoUA residue, poorly bound to M1 macrophages. The 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

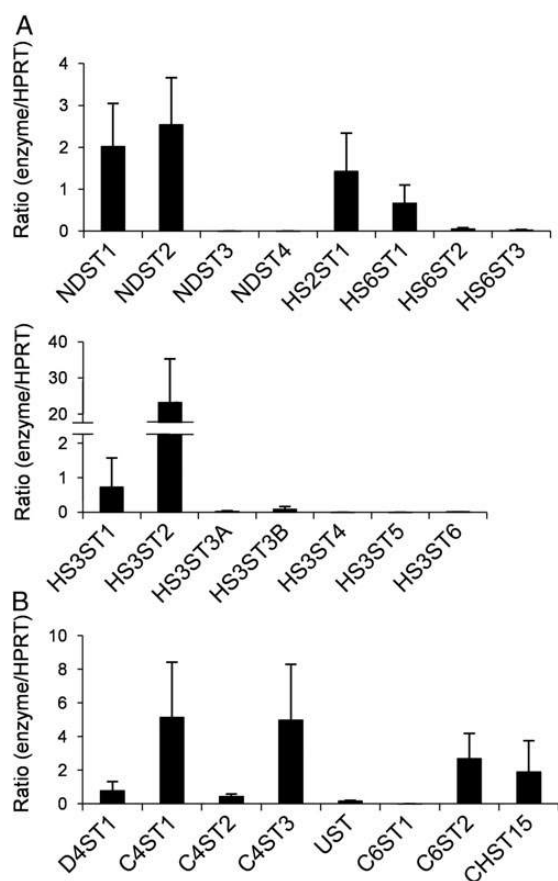


Fig. 3. Expression of mRNA encoding HS sulfotransferases in non-activated (M0) macrophages. Following reverse transcription of RNA extracted from non-activated MDM, the level of expression of HS (A) and CS/DS (B) sulfotransferases was quantified by real-time PCR. Relative transcript abundance was normalized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

macrophages. Finally, cell staining with IO3H10, which reacts with CS but not DS epitopes, was found higher in M1 macrophages (Figure 2B). Although the reactivity of anti-GAG antibodies was not discriminant to define GAG sequences, these results are informative of the subtle changes in the structural features of every type of cell-surface GAGs during macrophage polarization.

In order to provide structural information on the changes in HS and CS/DS composition, total GAGs purified from M1 or M2 macrophages were digested with either a mixture of heparinases or chondroitinase ABC. The resulting disaccharides were then labelled with 2-aminoacridone (AMAC) and analyzed by reverse phase-high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with fluorescent detection (Supplementary data, Figure S2). As already described in Deakin and Lyon (2008), the fluorescence profiles contained identifiable peaks, which are representative of the typical HS and CS/DS components. Analysis of HS digest from M1 macrophages revealed an overall low level of sulfation (~ 0.35 sulfate/disaccharide on average), coupled to a relative high amount of the non-sulfated Δ UA-GlcNAc disaccharide (77.4%). Moreover, it did not contain a great abundance of both the disulfated Δ UA2S-GlcNS (2.3%) and trisulfated Δ UA2S-GlcNS6S (3.3%) disaccharides, indicating that HS species from M1 macrophages had an overall weak level of 2-O-sulfation. Analysis of CS/DS digest from M1 macrophages indicated a composition dominated by the monosulfated Δ UA-GalNAc4S disaccharide (71.4%), with considerably lower amount of monosulfated Δ UA-GalNAc6S (3.1%) and disulfated Δ UA-GalNAc4S6S (1.7%) disaccharides. As expected, compositional differences were seen in both HS and CS/DS from M2 macrophages when compared with the corresponding GAGs from M1 macrophages (Figure 2C). Analysis of HS component revealed an overall higher sulfation level (~ 0.5 sulfate/disaccharide on average), which is accompanied with a decrease in the abundance of the Δ UA-GlcNAc disaccharide. Moreover, the relative increase in the level of sulfated disaccharides was coupled to a substantial higher amount of the disulfated Δ UA2S-GlcNS disaccharide (11.7%), which could reflect an enhancement in the reaction of HS 2-O-sulfation in M2 macrophages. Due to the unavailability of commercial standards, 3-O-sulfated disaccharides cannot be directly identified and quantified. However, very small peaks around the Δ UA2S-GlcNS6S standard may contain such rare components. Most notably, the peak named (a) in the elution profile of HS digest from M2 macrophages (Supplementary data, Figure S2, panel C) could be the trisulfated disaccharide containing a 3-O-sulfo group in addition to 2-O- and N-sulfo groups, which has been already identified in cells overexpressing HS3ST isoenzymes (Vijaya Kumar et al. 2014). Finally, CS/DS digest from M2 macrophages had a higher sulfation level than that derived from M1 macrophages (~ 1.1 versus ~ 0.75 sulfate/disaccharide, respectively) but still retained the relative abundance of the Δ UA-GalNAc4S disaccharide (78.8%). It contained a substantial higher amount of the disulfated Δ UA-GalNAc4S6S disaccharides (9.7 versus 1.7% in CS/DS component from M1 macrophages). Moreover, a significant level of disaccharides were 2-O-sulfated (5.3 versus 0.9% in M2 and M1 macrophages, respectively), suggesting that a specific subpopulation of CS/DS was enriched in M2 macrophages by enhancement of the reactions of 2-O- and 6-O-sulfation.

Expression of GAG sulfotransferases in polarized macrophages

In the following experiments, we analyzed whether difference in GAG 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 catalyzed 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 catalyzed by a single enzyme, termed HS2ST1. In contrast 6-O-sulfation can be catalyzed 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 catalyzed by eight sulfotransferases. Four isoenzymes are involved in the reaction of 4-O-sulfation. Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 (C4ST1), C4ST2 and C4ST3 are preferably acting on GalNAc residues in CS, whereas dermatan 4-O-sulfotransferase 1 (D4ST1) 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 as chondroitin 6-O-sulfotransferase 1 and 2 (C6ST1 and C6ST2), add sulfate groups to the C6 of GalNAc residues, while the third, termed GalNAc4S-6ST (or CHST15 for carbohydrate sulfotransferase-15), specifically catalyses 6-O-sulfation of 4-O-sulfated GalNAc residues. Finally, uronyl-2-O-sulfotransferase (UST) specifically transfers a sulfate group to the C2 of either GlcUA or IdoUA residues in CS/DS chains (Mikami and Kitagawa 2013).

The expression of sulfotransferases was first assessed by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT–PCR) in non-activated macrophages (M0) (Figure 3). We found that M0 macrophages expressed mRNA encoding 11 HS sulfotransferases, the strongest 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 interindividual 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 I, marked variations in mRNA levels of 6 out of 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 out of 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.

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 I 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. 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 characterized 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, at least for these three examples, finely modify GAG sulfation in a polarization-dependent manner.

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 analyzed 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 with the number of initially added cells (0.1×10^6 per sample) (Figure 6A). We found that removal of serum in culture medium potently 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 the 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 analyzed the role of M2 macrophages in the promotion of FGF-2-dependent cell proliferation, by using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labelled MDA-MB-231 cells. As shown in Figure 6B, FGF-2 alone

Table I. Analysis of the expression of HS and CS/DS sulfotransferases in non-activated (M0), pro-inflammatory (M1) and alternative (M2) macrophages

| Gene name | Gene symbol | M0 | M1 | M2 | M1 : M2 ratio |
|------------------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| N-Deacetylase/N-sulfotransferase 1 | NDST1 | 2.02 ± 1.25 | 4.24 ± 2.6 | 1.98 ± 0.84 | 2.14* |
| N-Deacetylase/N-sulfotransferase 2 | NDST2 | 2.54 ± 1.31 | 4.21 ± 2.22 | 2.15 ± 1.28 | 1.96** |
| N-Deacetylase/N-sulfotransferase 3 | NDST3 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| N-Deacetylase/N-sulfotransferase 4 | NDST4 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| HS 2-O-sulfotransferase | HS2ST | 1.43 ± 1.05 | 0.53 ± 0.48 | 2.81 ± 1.44 | 0.19** |
| HS 6-O-sulfotransferase 1 | HS6ST1 | 0.67 ± 0.56 | 0.62 ± 0.55 | 1.19 ± 1.17 | 0.52 |
| HS 6-O-sulfotransferase 2 | HS6ST2 | 0.051 ± 0.039 | 0.058 ± 0.053 | 0.063 ± 0.04 | 0.93 |
| HS 6-O-sulfotransferase 3 | HS6ST3 | 0.024 ± 0.017 | 0.029 ± 0.034 | 0.017 ± 0.014 | 1.75 |
| HS 3-O-sulfotransferase 1 | HS3ST1 | 0.73 ± 1.24 | 0.039 ± 0.028 | 0.32 ± 0.32 | 0.12* |
| HS 3-O-sulfotransferase 2 | HS3ST2 | 53.5 ± 37.1 | 1.65 ± 2.22 | 65.2 ± 45.09 | 0.025* |
| HS 3-O-sulfotransferase 3A | HS3ST3A | 0.027 ± 0.019 | 0.027 ± 0.022 | 0.027 ± 0.025 | 0.98 |
| HS 3-O-sulfotransferase 3B | HS3ST3B | 0.089 ± 0.11 | 1.69 ± 1.2 | 0.026 ± 0.011 | 65.4* |
| HS 3-O-sulfotransferase 4 | HS3ST4 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| HS 3-O-sulfotransferase 5 | HS3ST5 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| HS 3-O-sulfotransferase 6 | HS3ST6 | 0.003 ± 0.002 | 0.002 ± 0.001 | 0.002 ± 0.001 | 1 |
| DS 4-O-sulfotransferase 1 | D4ST1 | 0.78 ± 0.65 | 0.84 ± 0.76 | 0.59 ± 0.48 | 1.43 |
| CS 4-O-sulfotransferase 1 | C4ST1 | 5.14 ± 4.46 | 16.6 ± 9.27 | 6.72 ± 4 | 2.47* |
| CS 4-O-sulfotransferase 2 | C4ST2 | 0.43 ± 0.20 | 0.45 ± 0.5 | 0.62 ± 0.45 | 0.74 |
| CS 4-O-sulfotransferase 3 | C4ST3 | 4.98 ± 4.21 | 0.59 ± 0.46 | 11.7 ± 11.25 | 0.05 |
| Uronyl-2-O-sulfotransferase | UST | 0.16 ± 0.07 | 0.1 ± 0.1 | 0.55 ± 0.25 | 0.17* |
| CS 6-O-sulfotransferase 1 | C6ST1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| CS 6-O-sulfotransferase 2 | C6ST2 | 2.68 ± 1.93 | 3.39 ± 2.99 | 2.98 ± 3.14 | 1.14 |
| GalNAc4S-6-O-sulfotransferase | CHST15 | 1.90 ± 2.65 | 1.35 ± 2.13 | 1.02 ± 1.05 | 1.33 |

The relative expression of mRNA encoding sulfotransferases was normalized with the transcript of HPRT. Data are expressed as the mean values ± SD from six different donors. n.d., not detectable.

t*-Test *P*-value < 0.05; *t*-test *P*-value < 0.01.

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 (×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 (Figure 6B). To explain these differences, cell surface binding of the growth factor was assayed in both macrophage subtypes by flow cytometry (Supplementary data, Figure S3) (Nedvetzki et al. 2003). A 3-fold higher fluorescent staining was seen at the surface of M2 macrophages when compared with M1 macrophages, indicating that polarization has also induced changes in the binding capacities of membrane-associated GAGs. Moreover, HS chains rather than CS/DS appeared to be involved in the interactions with FGF-2. Indeed, heparinase treatment strongly reduced the binding of FGF-2 to the surface of M2 macrophages, while chondroitinase had no notable inhibitory effect.

These results indicate 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 and viability of MDA-MB-231 cells was measured by using CFSE (Figure 6C) and MTS/PMS assays (Figure 6D), respectively. 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 (×1.4 at day 5 when compared with FGF-2 alone). The involvement of HS chains in this process was also demonstrated by treatment of fixed macrophages with GAG lyases. Indeed, removal of cell-surface HS by heparinases potentially reduced FGF-2-induced cell proliferation, while the same treatment with chondroitinase ABC had no significant inhibitory effect (Figure 6C). In summary, our results show that surface HS 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,

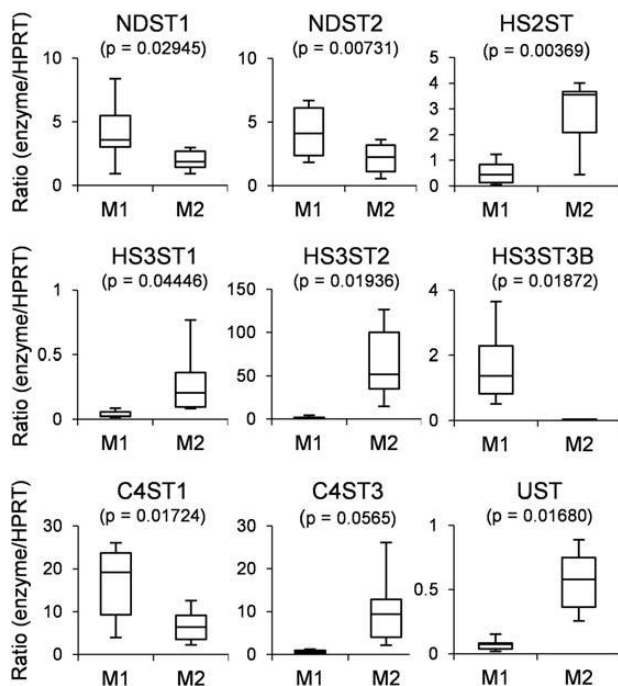


Fig. 4. Variations in the expression of HS and CS/DS sulfotransferases in polarized macrophages. MDM were activated in the presence of either LPS/IFN- γ or IL-4/IL-13 for 2 days in order to obtain fully polarized M1 and M2 macrophages, respectively. Following extraction of total RNA and reverse transcription, 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 of <0.05 were considered as significant.

respectively. Full macrophage polarization was confirmed by analyzing the expression of specific markers of M1 and M2 phenotypes. 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 analyzed 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 nine sulfotransferases between M1 and M2

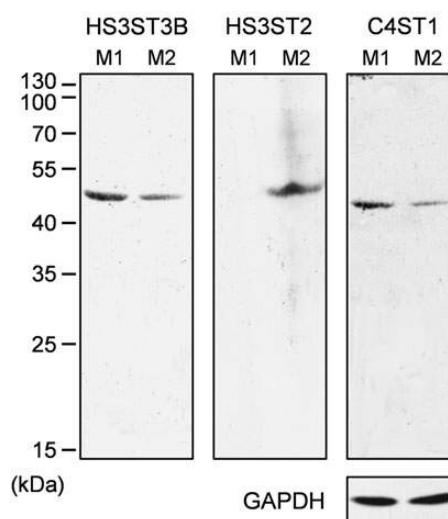


Fig. 5. Detection of HS3ST2, HS3ST3B and C4ST1 in polarized macrophages. After polarization, M1 and M2 macrophages from the same donor were lysed and proteins were separated by SDS-PAGE. Variations in HS3ST2, HS3ST3B and C4ST1 in both macrophage subtypes was analyzed by western blot as described in Materials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

macrophages. A striking difference was related to the expression of HS3STs. Indeed, HS3ST3B was strongly induced in M1 macrophages, indicating that the expression of this isoenzyme is upregulated 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 catalyze the same reaction of 3-O-sulfation in vitro (Thacker et al. 2014). 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 then assessed by the use of a panel of anti-GAG antibodies. 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. Cell immunostaining was significantly half as much in M1 than in M2 macrophages, indicating that 3-O-sulfated epitopes were less represented in these cells when compared with M2 macrophages. This difference could be partly linked to the amount of HS, which is twice as much in M2 than in M1 macrophages (Figure 2). Alternatively, difference in cell immunostaining could be linked to difference in the reaction of 3-O-sulfation.

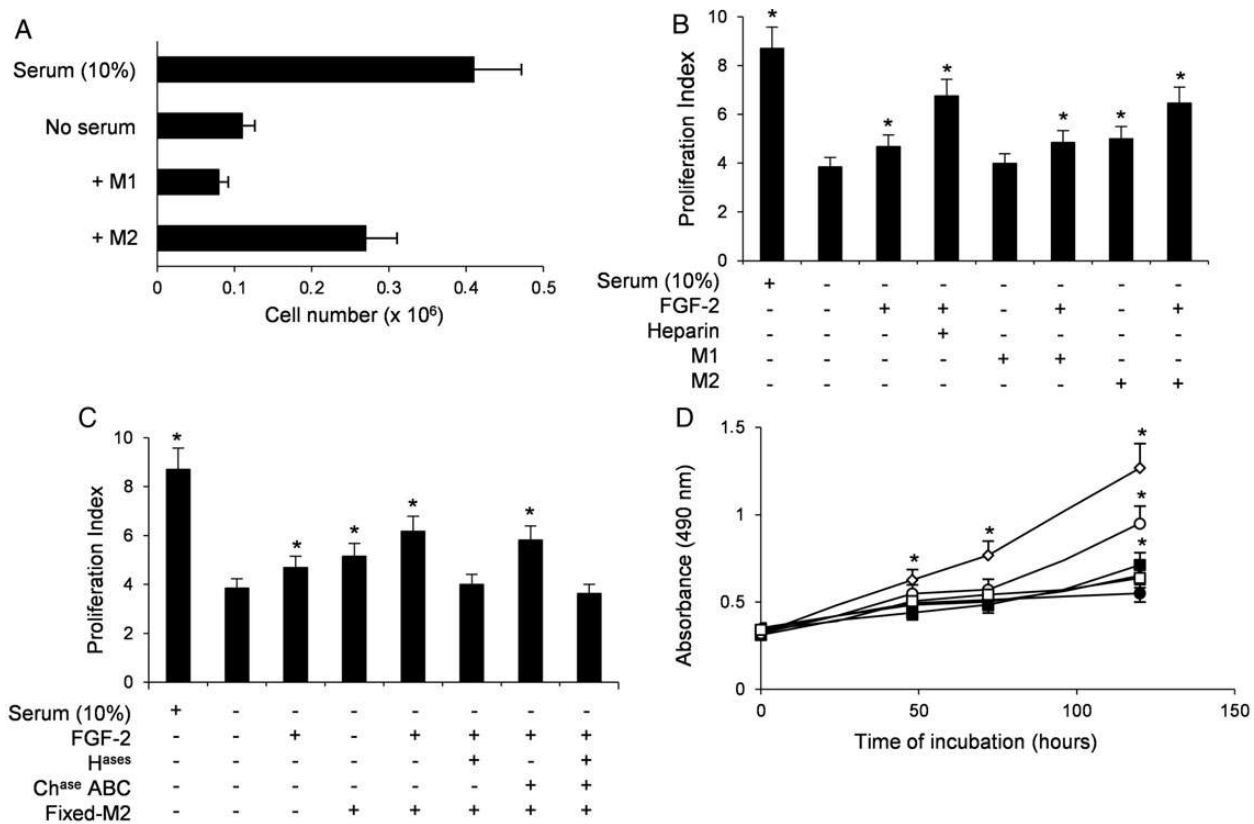


Fig. 6. Presentation of FGF-2 by GAGs expressed at the surface of polarized macrophages. The capability of polarized macrophages to present FGF-2 to adjacent tumor cells was tested in a model of co-culture with the human breast cancer cell line MBA-MB-231. (A) Fully differentiated M1 or M2 macrophages 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 M1 or M2 macrophages at a ratio 1 : 1. After 5 days of culture, the intensity of CFSE signal in tumor cells was analyzed 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 a mixture of heparinases I, II, III (1.25 mU/mL of each) or 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 analyzed 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 h 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 GAG 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, $P < 0.05$).

Although the expression of HS3ST3B was increased in M1 macrophages compared with the low levels detected in M2 macrophages, HS3ST2 was strongly overexpressed 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 lead 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 (Dennisen 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.

To ascertain that macrophage polarization was accompanied by change in HS and CS/DS structures, we examined the disaccharide compositions of GAG preparations from M1 and M2 macrophages. Disaccharides resulting from digestion with either a mixture of heparinases or chondroitinase ABC were fluorescently labelled with AMAC and separated by RP-HPLC. As expected, the elution profiles contained some identifiable peaks, which are representative of the disaccharide species usually found in HS and CS/DS populations. Compositional analysis of both HS and CS/DS components from M2 macrophages revealed an overall higher level of sulfation when

compared with the corresponding GAGs from M1 macrophages (Figure 2C). The most remarkable differences may be attributed to the formation of 2-O-sulfated species in M2 macrophages. Indeed, the relative amount of 2-O-sulfated disaccharides in HS and CS/DS digests were increased by ~2.5- and ~5-fold, respectively. These differences suggest that specific subpopulation of HS and CS/DS may be enhanced specifically in M2 macrophages by enrichment with 2-O-sulfation, which is consistent with the high levels of both HS2ST1 and UST in these cells. Unfortunately, 3-O-sulfated disaccharides cannot be directly identified in the elution profiles of HS digests. However, a minor product that elutes just after the Δ UA2S-GlcNS6S standard may be the Δ UA2S-GlcNS3S disaccharide. The peak was characterized in the elution profile of HS disaccharides from M2 macrophages, which is consistent with the high expression of HS3ST2 in these cells. Indeed, a significant proportion of this 3-O-sulfated disaccharide was previously reported in cells transfected with HS3ST2 constructs and confirmed by GAG disaccharide analysis (Vijaya Kumar et al. 2014). Given the high expression of HS3ST3B and HS3ST2 transcripts in M1 and M2 macrophages, respectively, a larger abundance of 3-O-sulfated disaccharides could be expected. However, it has been reported that the catalytic activity of these HS3ST isoenzymes is dependent on the presence of 2-O-sulfated substrate acceptors (Thacker et al. 2014). This substrate specificity may explain the low frequency of 3-O-sulfated disaccharides and the relative enhancement of these rare components by enrichment with 2-O-sulfation.

Overall, immunological characterization and compositional disaccharide analysis of GAGs from polarized macrophages fitted well with the profile of expression of HS and CS/DS 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 (Delehede 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 HS integrity, as demonstrated by heparinase treatment. Taken together, our results demonstrate the ability of HS 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 was overexpressed in M2 macrophages, which is related to an increase in the relative abundance of 2-*O*-sulfated disaccharides when compared with HS from M1 macrophages. These data indicate that the reaction of 2-*O*-sulfation of HS is increased as a response of alternative polarization, which could explain why M2 macrophages are efficient cells to present FGF-2 to adjacent cancer cells.

Collectively, our results show that macrophage polarization is accompanied by marked changes in the expression of certain GAG-modifying enzymes, which in turn 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.

Material and methods

Materials

Recombinant human cytokines (FGF-2, IFN- γ , IL-4 and IL-13) were purchased from Tebu-Bio PeproTech. Antibodies to GAG epitopes have been described in Deligny et al. (2010) and were kindly provided by Toin van Kuppevelt (University of Nijmegen, the 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%. MDMs were obtained by incubating freshly isolated monocytes (10^6 cells/mL) in complete RPMI 1640 10% fetal 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'-CCACGTGTTGAGATCATTGGC-3' (forward) and 5'-TTCTTGATGGCCTTCGATTC-3' (reverse); IL-12 (NM_000882.3), 5'-ACCAGGTGGAGTTCAGACC-3' (forward) and 5'-TGGCACAGTCTCACTGTTGA-3' (reverse); FN1 (NM_212482.1), 5'-TGACACTTATGAGCGTCT-3' (forward) and 5'-AAACACTTCTCAGCTATGGG-3' (reverse); CCL18 (NM_002988.2), 5'-AAGAGC TCTGCTGCCTCGTCTA-3' (forward) and 5'-CCTCAGGCATTCA GCTTCA-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 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (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°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at specific temperature of annealing (67°C for NDST4, HS3ST1 and HS3ST4; 68°C for HS3ST6; 60°C for all the others) and 30 s at 72°C. The fluorescence data were measured at the end of each cycle. A melting curve (55–95°C at 1°C interval) was constructed for each primer pair to check for the presence of one gene-specific peak. The amplification efficiency of each primer pair was performed on serial dilutions of cDNA. Triplicate PCRs were prepared for each sample. The point at which the PCR product is first detected above a fixed threshold, termed cycle threshold (C_t), was determined for each sample, and the average C_t of triplicate samples was used for further analysis. The relative quantification of transcripts was calculated as described previously (Pfaffl 2001).

GAG quantitation

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°C for 16 h. Following inactivation of Pronase E for 5 min at 100°C, samples were centrifuged at $10,000 \times g$ 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 $400 \times g$ 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°C . The precipitates were pelleted by centrifugation at $10,000 \times g$ for 1 h 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, MgCl_2 2 mM, pH 6.5), and treated with benzonase and type V neuraminidase from *Clostridium perfringens* at final concentrations of 1.2 and 0.1 U/mL, respectively, for 4 h at 37°C. After inactivation of the enzymes and clarification of the samples, GAGs were precipitated with 9 volumes of cold ethanol overnight at -20°C . The precipitates were pelleted and air-dried.

Purified GAGs were suspended in either heparinase buffer (Tris 20 mM, CaCl_2 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 GAG standards (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 μ L of serial dilutions of standard GAGs or samples were placed in a 96-well plate. Two hundred microliters of a solution of 25 mM sodium tetraborate in sulfuric acid were added and the plate was heated for 30 min at 80°C. After cooling at room temperature, 50 μ L of 0.125% carbazole in absolute ethanol was 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 (2–25 μ g/sample) was done with CS-A. Relative GAG abundance was normalized to protein content (micro BCA protein assay reagent kit, Pierce Biotechnology).

Disaccharide compositional analysis of GAGs

Composition of both HS and CS/DS from polarized macrophages was analyzed by using a fluorescent method of pre-column labelling of disaccharides. To this end, GAG extraction was conducted as above, with minor modifications. Following treatment with Pronase E (1.5 mg/mL) and benzonase (250 mU/mL), cell lysate (corresponding to 20×10^6 polarized macrophages) was clarified and loaded on DEAE-Sepharose column (G&E Healthcare). After extensive wash with phosphate buffer containing 0.3 M NaCl, remaining bound molecules were eluted with the same buffer containing 2 M NaCl. Chloroform was then added to the sample (v/v) and the mixture was stirred vigorously for 10 min. Aqueous phase was recovered and dialyzed against water for 16 h at 4°C (Slide-A-Lyser 2000Da, Thermo Scientific). After freeze drying, material (5 μ g of total GAGs, as quantified by carbazole assay) was dissolved in lyase digestion buffer and treated either with heparinases (10 mU each/sample) or with chondroitinase ABC (Sigma) (50 mU/sample) for 16 h at 37°C. Sample was then filtered on an Amicon 3000-Da unit (Millipore) and the fraction containing disaccharides was collected and freeze-dried. AMAC-labelling of disaccharides was performed as described in Deakin and Lyon (2008), with some modifications as follows. Dried disaccharide standards (Iduron) or enzyme digests of GAGs were dissolved in 10 μ L of glacial acetic acid/DMSO (15:85, v/v) solution containing 0.1 M AMAC. After 20 min of incubation at 20°C, 10 μ L of freshly prepared sodium cyanoborohydride solution (1 M in water) was added and the samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 3 min to pellet insoluble material. The reaction of derivatization was then carried out for 5 h at 45°C. Finally, 15 μ L of 50% (v/v) DMSO was added to the samples and aliquots were then stored at -20°C in the dark prior HPLC analysis.

For RP-HPLC separation, AMAC-labelled disaccharides were diluted with water to a final volume of 200 μ L and applied to a Shodex C18-M column (4.6 \times 250 mm) equilibrated in 60 mM ammonium acetate, pH 5.6 (eluent A), running on a Varian Prostar 260 HPLC system. After a 7 mL gradient of 0–10% solution B (100% methanol), disaccharides were eluted over a 35 mL linear gradient of 10–30% solution B at a flow rate of 0.7 mL/min. The column was finally regenerated by washing with gradient of 30–100% solution B for 15 min before returning to solution A. Disaccharides were detected by in-line fluorescence (excitation at 428 nm and emission at 525 nm), using a Varian ProStar 363 detector, and data were analyzed with the Star software (v6.43).

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 analyzed with CellQuest software.

Western blot analysis of sulfotransferases

Cells (8×10^6 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 X-100. 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 1×10^5 cells/mL and incubated overnight in serum-starved medium. Thereafter, an equal volume of culture medium containing M1 or M2 macrophages (1.10^5 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 either a cocktail of heparinases I, II and III (1.25 U/mL of each) or chondroitinase ABC (0.75 U/mL) or both, for 2 h at 37°C. Proliferation of cancer cells was measured by CFSE or MTS/PMS assays (see Supplementary data), 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 µM) in PBS for 15 min at 37°C. After washing with prewarmed 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 analyzed 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 µL of working solution of MTS/PMS was added to each well (100 µL) 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 analyzed by Student's *t*-test with a threshold of $P < 0.05$.

Acknowledgements

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.

Supplementary data

Supplementary data for this article are available online at <http://glycob.oxfordjournals.org/>.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding

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

Abbreviations

AMAC, 2-aminoacidone; 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; DC-SIGN, dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin; DS, dermatan sulfate; FCS, fetal calf serum; FGF-2, fibroblast growth factor-2; FN1, fibronectin 1; GAGs, glycosaminoglycans; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GlcUA, glucuronic acid; 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-1β, 4, 6, 10, 12, 13, interleukin 1β, 4, 6, 10, 12, 13; LPS, lipopolysaccharide; MDM, monocyte-derived macrophage; NDST, *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase; RP-HPLC, reverse phase-high-performance liquid chromatography; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TNF-α, tumor necrosis factor-α; UST, uronyl-2-sulfotransferase; VSV, vesicular stomatitis virus.

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.
- Deakin JA, Lyon M. 2008. A simplified and sensitive fluorescent method for disaccharide analysis of both heparan sulfate and chondroitin/dermatan sulfates from biological samples. *Glycobiology*. 18:483–491.
- 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*. 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*. 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.
- Nedvetzki S, Golan I, Assayag N, Gonen E, Caspi D, Gladnikoff M, Yayon A, Naor D. 2003. A mutation in a CD44 variant of inflammatory cells enhances the mitogenic interaction of FGF with its receptor. *J Clin Invest*. 111:1211–1220.
- 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:a004952.
- Smetsers TF, 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*. 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. 2014. Heparan sulfate 3-O-sulfation: A rare modification in search of a function. *Matrix Biol J*. 35:60–72.
- 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.
- Vijaya Kumar A, Salem Gassar E, Spillmann D, Stock C, Sen Y-P, Zhang T, van Kuppevelt TH, Hülsewig C, Koszłowski EO, Pavao MSG, et al. 2014. HS3ST2 modulates breast cancer cell invasiveness via MAP kinase- and Tcf4 (Tcf712)-dependent regulation of protease and cadherin expression. *Int J Cancer*. 135:2579–2592.
- 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.

Annexe 2

Regulation of the Expression of Heparan Sulfate 3-*O*-Sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by Inflammatory Stimuli in Human Monocytes

Anne-Sophie Sikora, Maxime Delos, Pierre Martinez, Mathieu Carpentier, Fabrice Allain, and Agnès Denys*

Université Lille, CNRS, UMR 8576-UGSF-Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000, Lille, France

ABSTRACT

Heparan sulfate (HS) is recognized as an important player in a wide range of dynamic steps of inflammatory reactions. Thereby, structural HS remodeling is likely to play an important role in the regulation of inflammatory and immune responses; however, little is known about underlying mechanism. In this study, we analyzed the regulation of expression of HS 3-*O*-sulfotransferases (HS3STs) in response to inflammatory stimuli. We found that among the seven HS3ST isoenzymes, only the expression of HS3ST3B was markedly up-regulated in human primary monocytes and the related cell line THP1 after exposure to TLR agonists. TNF- α was also efficient, to a lesser extent, to increase HS3ST3B expression, while IL-6, IL-4, and IFN- γ were poor inducers. We then analyzed the molecular mechanisms that regulate the high expression of HS3ST3B in response to LPS. Based on the expression of HS3ST3B transcripts and on the response of a reporter gene containing the *HS3ST3B1* promoter, we provide evidence that LPS induces a rapid and strong transcription of *HS3ST3B1* gene, which was mainly dependent on the activation of NF- κ B and JNK signaling pathways. Additionally, active p38 MAPK and de novo synthesized proteins are involved in post-transcriptional mechanisms to maintain a high level of HS3ST3B mRNA to a steady state. Altogether, our findings indicate that *HS3ST3B1* gene behaves as a primary response gene, suggesting that it may play an important role in making 3-*O*-sulfated HS with specific functions in the regulation of inflammatory and immune responses. *J. Cell. Biochem.* 117: 1529–1542, 2016. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: HEPARAN SULFATE; 3-*O*-SULFOTRANSFERASE; INFLAMMATION; GENE REGULATION

Heparan sulfates (HS) are linear polysaccharides composed of repeating disaccharide units of sulfated uronic acid and glucosamine (GlcN) residues. They are involved in numerous biological processes, which rely on their ability to selectively interact with a large panel of proteins [Esko and Selleck, 2002; Zhang, 2010]. As example, they are implicated in the formation of a chemokine gradient on inflamed endothelium that addresses circulating leucocytes to the inflammatory site. Cell surface HS are also involved in the binding of many cytokines and growth factors, thus, promoting their accumulation at high concentration in the appropriate location to encounter their target cells and to facilitate the assembly with cognate receptors to initiate signal

transduction [Celie et al., 2009; Sarrazin et al., 2011; Mortier et al., 2012]. Structural distinction in functional HS sequences is derived from enzymatic modifications in the Golgi apparatus of the nascent polymer composed of alternating glucuronic acid (GlcUA) and *N*-acetyl GlcN (GlcNAc) units. These modifications involve HS biosynthetic enzymes including *N*-deacetylases/*N*-sulfotransferases (NDSTs), C5-epimerase, and 2-*O*, 3-*O*, and 6-*O*-sulfotransferases [Esko and Selleck, 2002]. In the stepwise scheme of HS biosynthesis, the non-sulfated precursor is first subject to *N*-deacetylation/*N*-sulfation of GlcNAc residues, which creates the prerequisite substrate needed for the next enzymatic modifications. This crucial reaction can be catalyzed by four isoenzymes, which display subtle

Abbreviations: ARE, AU-rich elements; AT-III, antithrombin-III; CHX, cycloheximide; FCS, fetal calf serum; GAGs, glycosaminoglycans; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GlcUA, glucuronic acid; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; HS, heparan sulfate; HS2ST, HS 2-*O*-sulfotransferase; HS3ST, HS 3-*O*-sulfotransferase; HS6ST, HS 6-*O*-sulfotransferase; IdoUA, L-iduronic acid; IL-4, 6, interleukin 4, 6; LPS, lipopolysaccharide; NDST, *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase; PGN, peptidoglycan; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TLR, toll-like receptor; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; 3' UTR, 3' untranslated region.

Grant sponsor: Centre National de la Recherche Scientifique; Grant sponsor: Université de Lille 1.

*Correspondence to: Agnès Denys, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. E-mail: agnes.denys@univ-lille1.fr

Manuscript Received: 21 April 2015; Manuscript Accepted: 16 November 2015

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 17 November 2015

DOI 10.1002/jcb.25444 • © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

differences in enzymatic activity. Even though NDST1 and NDST2 exhibit similar activities *in vitro*, they have no redundant but rather complementary activity *in vivo*, making highly *N*-sulfated HS sequences [Forsberg et al., 1999; Aikawa et al., 2001; Deligny et al., 2010]. The further modifications include C5-epimerization of some GlcUA into IdoUA, 2-*O*-sulfation of uronic acid residues, and 3-*O*- and 6-*O*-sulfation of GlcN units. The reaction of C2 sulfation is catalyzed by a single enzyme, termed HS2ST1. In contrast, 6-*O*-sulfation can be catalyzed by three isoenzymes (HS6ST1, HS6ST2, and HS6ST3) and 3-*O*-sulfation by seven isoenzymes (HS3ST1, HS3ST2, HS3ST3A, HS3ST3B, HS3ST4, HS3ST5, and HS3ST6). HS3STs can be classified into three subfamilies, in relation to the fine difference in their substrate specificity. While HS3ST1 is known to generate a HS-binding site for antithrombin-III (AT-III) via the sulfation at the C3 position of a GlcNS attached to a GlcUA residue, HS3ST2, HS3ST3A, HS3ST3B, HS3ST4, and HS3ST6 transfer sulfate groups to the 3-OH position of GlcNS or GlcNH₂ adjacent to an IdoUA2S residue, thus providing an entry receptor for the gD protein of herpes simplex virus HSV-1. In contrast, HS3ST5 exhibits broad substrate specificity and generate products with affinity to HSV-1 and AT-III [Liu et al., 1999a, 1999b; Zhang et al., 2001; Xia et al., 2002; Thacker et al., 2014].

Although the reaction of 3-*O*-sulfation can be catalyzed by the largest family of HS sulfotransferases, it is the least abundant modification in HS and, to date, very few biological mechanisms have been reported to be dependent on 3-*O*-sulfated HS [Thacker et al., 2014]. In previous works, we reported that memory/activated T lymphocytes, monocytes/macrophages, and related cell lines express high level of HS3ST3B, which may explain the dependence on 3-*O*-sulfated HS for the binding of cyclophilin B (CyPB) to these responsive cells. We then demonstrated that specific silencing of the expression of HS3ST3B by RNA interference strongly reduced the binding of CyPB to T lymphocytes and consequently abolished the responses triggered by this inflammatory factor [Vanpouille et al., 2007; Deligny et al., 2010]. More recently, 3-*O*-sulfated HS have been associated to the regulation of the responses mediated by natural killer (NK) cells. Indeed, KIR2DL4, a member of the killer cell receptor (KIR) family, was found to functionally interact with HS by a mechanism dependent on the expression of HS3ST3B [Brusilovsky et al., 2013]. Other studies have reported that the expression of HS3STs could be modulated in response to inflammatory stimuli. As examples, Krenn et al. [2008] reported that the expression of HS3ST1, the most abundant HS3ST isoform expressed in microvascular endothelial cells, was diminished after a 20h long exposure to TNF (Tumor Necrosis Factor)- α , while the expression of HS3ST3B was up-regulated. More recently, we demonstrated that macrophage polarization drastically modified the profiles of expression of numerous HS sulfotransferases, which was accompanied by the biosynthesis of HS with distinct structural features. The striking difference between inflammatory (M1) and alternative (M2) macrophage subtypes was observed with the expression of HS3STs. Indeed, HS3ST3B was strongly induced in M1 macrophages, indicating that the expression of this isoenzyme is up-regulated by pro-inflammatory stimuli. In contrast, HS3ST1 and HS3ST2 were highly expressed in M2 macrophages, while they were barely detected in M1 macrophages [Martinez et al., 2015]. Altogether, these studies suggest that HS3STs

may be differentially involved in the synthesis of 3-*O*-sulfated HS with specific functions in inflammatory and immune responses. However, still little is known about the regulatory mechanisms controlling the expression of these sulfotransferases.

In the current work, we analyzed the regulation of expression of HS3STs in response to inflammatory stimuli. These experiments were conducted with human primary monocytes and the related cell line THP1, as these cells are highly responsive to TLR agonists and inflammatory cytokines. We showed that among the seven HS3ST isoenzymes, only the expression of HS3ST3B was markedly up-regulated after LPS exposure. Peptidoglycan (PGN) and, to a lesser extent, TNF- α , were also efficient to increase the expression of HS3ST3B, while interleukin IL-6, IL-4, and interferon (IFN)- γ were poor inducers. We then analyzed the molecular mechanisms that regulate the high expression of HS3ST3B in response to LPS. To this end, we compared the expression of endogenous HS3ST3B to the response of a reporter gene containing the promoter of the gene encoding the enzyme, namely *HS3ST3B1*. Our results support a model in which rapid and strong induction of *HS3ST3B1* transcription is dependent on the activation of NF- κ B and JNK signaling pathways, while post-transcriptional mechanisms involving active p38 MAPK and de novo synthesized proteins maintained a high level of HS3ST3B mRNA to a steady state. Altogether, our findings indicate that *HS3ST3B1* gene behaves as a primary response gene, suggesting that it may play an important role in making 3-*O*-sulfated HS with specific functions in the regulation of inflammatory and immune responses.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

Recombinant human cytokines (TNF- α , IL-4, IL-6, and IFN- γ) were purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ). PGN (*Staphylococcus aureus*), LPS (*Escherichia coli* O55B5), cycloheximide (CHX), actinomycin D, rabbit antibody to human HS3ST3B, and mouse monoclonal antibody to human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The absence of contamination in LPS and PGN samples has been checked by using a cell-based assay with HEK-BlueTM-hTLR2 and HEK-BlueTM-hTLR4 cell lines from Invivogen (Toulouse, France). Horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit and anti-mouse antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). IKK (I-Kappa B Kinases) inhibitor III, SB203580 (p38 MAPK inhibitor), and JNK inhibitor II were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). U0126 (ERK1/2 inhibitor) was obtained from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). HS4C3 antibody was kindly provided by Toon Van Kuppevelt (University of Nijmegen, Netherlands) [Deligny et al., 2010].

CELLS

Human leukemia THP1 cells (ECACC n°88081201, Porton Down, Salisbury, UK) were routinely cultured at 37°C in RPMI 1,640 medium supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and 20 μ M β -mercaptoethanol, in 5% CO₂ enriched atmosphere. Prior stimulation, THP1 cells were suspended

at 0.6×10^6 per mL in complete RPMI medium without β -mercaptoethanol for 24 h. Primary mononuclear cells were isolated from human citrated venous blood samples obtained from the local blood transfusion center (Etablissement de Transfusion Sanguine, Lille, France) by density centrifugation on Lymphoprep (Eurobio-Abcys, Courtaboeuf, France). Monocytes were purified by selection with magnetic beads coupled to CD14, according to instructions of the manufacturer (BD Biosciences, NJ). Monocyte purity was >95% when assessed by flow cytometry. Freshly isolated monocytes were cultured at 1×10^6 per mL in complete RPMI 1,640 without β -mercaptoethanol. Each experiment performed with primary monocytes was conducted with cells isolated from a single donor and repeated at least three times with distinct donors.

CELL STIMULATION

THP1 cells or primary monocytes were seeded into six-well plates (3×10^6 cells/well) in RPMI 1,640 medium with 2.5% FCS and stimulated for the indicated times with either TLR ligands or recombinant human cytokines. In order to identify the signaling events involved in the regulation of HS3ST3B expression, THP1 cells were pretreated for 1 h prior stimulation with various inhibitory drugs targeting NF- κ B or MAPK pathways. At the end of incubation time, total RNA was extracted and the expression level of HS3ST3B mRNA was determined by real-time RT-PCR as described below. For analysis of the rate of HS3ST3B mRNA decay, THP1 cells were stimulated with LPS for 4 h, and transcription was then inhibited by the addition of actinomycin D at 10 μ g/mL. At various time points after the addition of the inhibitor, total RNA was isolated and the rate of mRNA degradation was subsequently determined by real-time RT-PCR.

RNA ISOLATION AND REAL-TIME RT-PCR

Total RNA was isolated from 3×10^6 cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Reverse transcription was performed from 1 μ g of total RNA by using a Maxima First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific Fermentas, Waltham, MA). Each reaction of real-time PCR consisted of 25 μ L containing 2 μ L of diluted cDNA sample (1:5), 12.5 μ L of 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific Fermentas), 1 μ L of forward primer, 1 μ L of reverse primer (Eurogentec, Seraing, Belgium) depending of determined final primer concentration and 8.5 μ L of water. The transcript of HPRT was used as a control to normalize the expression of our genes of interest. 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]. The primer sets for *HS3ST1*, *HS3ST2*, *HS3ST4*, *HS3ST5*, and *HS3ST6* were described in Deligny et al. [2010] and for *HS2ST1*, *HS6ST1*, *HS6ST2*, *HS6ST3*, *HS3ST3A*, and *HS3ST3B1* in Götte et al. [2008]. Real-time PCR of heterologous nuclear RNA (hnRNA) was carried out with HS3ST3B-specific forward and reverse primers complementary to sequences in intron 1 and exon 2 of *HS3ST3B1*, respectively. PCR primers used were: forward (hnRNA_F),

5'-GGATTAGAAGTCGTGACCTTAAGACGTGTGGCCAG-3' and reverse (hnRNA_R), 5'-CGAAGTAACTGGGCGTCTTCTCCATGGT-GATCTGC-3'. The sequence of amplified product (142 bp) corresponds to nucleotides 14,344,947–14,345,089 of human chromosome 17 (GenBank accession no. NC_000017.11). To determine the level of genomic DNA contamination, identical reverse transcription reactions without reverse transcriptase were also amplified, and the values were subtracted as background. In all cases, PCR reactions were performed using the Mx3000P QPCR System (Agilent technologies, Santa Clara, CA) and relative expression of amplified products was calculated with the MxPro QPCR Software (Agilent technologies).

IMMUNOSTAINING OF CELL SURFACE HS BY FLOW CYTOMETRY

Cell surface HS were analyzed with anti-HS antibody HS4C3 as described in Deligny et al. [2010]. Non-specific binding was determined by using the isotype control antibody MPB49. Data were monitored on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) and analyzed with CellQuest software.

WESTERN BLOT ANALYSIS OF SULFOTRANSFERASES

Cells (12×10^6 per point) were lysed in 1 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH7.2) containing 1% of Triton X100, 20% of (v/v) glycerol, and a cocktail of protease inhibitors (Roche), overnight at 4°C. After clarification by centrifugation at 10,000g for 30 min at 4°C, the lysates were diluted 10 times with previous buffer, mixed with 10 mg adenosine 3',5'-diphosphate-agarose beads (Sigma), and incubated with gentle rocking overnight at 4°C. The beads were then washed two times with lysis buffer containing 0.1% Triton X100. Proteins bound to the beads were eluted with Laemmli buffer and boiled for 10 min. Proteins were separated by SDS-PAGE (10%, w/v) and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell BioScience). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS supplemented with 0.1% (v/v) Tween-20 and 3% (w/v) BSA and then probed overnight at 4°C with primary antibody to HS3ST3B in TBS supplemented with 1% (w/v) BSA. After washing, HRP-conjugated secondary antibodies were added for 1 h at room temperature. Signals were visualized using the ECL detection kit according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). Input controls were performed with anti-HPRT antibody to confirm equal loading of the samples.

CONSTRUCTION OF LUCIFERASE REPORTER GENE

Genomic DNA from THP1 cells was extracted with Nucleospin Blood kit following the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel). The sequence containing the putative *HS3ST3B1* promoter (–1,900 to +240 nt relative to the transcription start codon deduced from the transcript no. AK023723 [GenBank accession number]) was amplified with DyNAzyme Ext DNA polymerase (ThermoFisher Scientific) and DMSO as additive to overcome high T_m, by using the primers: sense, 5'-GCGCGTACCGGAAAGAAAAGCTAGAAA-GAAGTTATTGCTGAGAATAT-3' and antisense, 5'-AAATAGATCT-GACATGTTGCCCGCAGGAGCTGCAACTGGAACGGAAAG-3'. The underlined sequences correspond to 5'-*KpnI* and 3'-*BglII* restriction sites, which were introduced for further experiments. The PCR product was then digested with restriction enzymes *KpnI* and *BglII*

(New England BioLabs, Ipswich) and subcloned into pGL3-basic vector (Promega, Madison). Integrity of the construct was checked by DNA sequencing (GATC Biotech, Constance, Germany) with vector primers (RVprimer 3 and GLprimer 2) and intermediate primers (sense, 5'-TGCACCTCAGTGATGGATTTGTCC-3' and anti-sense, 5'-TCCAGCCTCCAAACTGCCGA-3'). The amplified sequence perfectly matched with GenBank accession no. NC_000017.11. Following transformation in Top 10 competent *E.coli*, the construct (named pGL3prHS3ST3B1) was purified with NucleoBond Xtra Midi Plus EndoFree kit (Macherey-Nagel).

LUCIFERASE REPORTER GENE ASSAY

THP1 cells were seeded in 24-well plates at a density of 0.1×10^6 cells/mL in 1 mL RPMI 1,640 medium without FCS and incubated for 18 h with transfection mixtures, consisting of either 0.5 μ g of pGL3prHS3ST3B1 or pGL3-basic plasmid and 1 μ L JetPEI-macrophage (Polyplus transfection, Illkirch, France). The promoter-less pGL3-basic expression was used as a control for vector backbone-based luciferase activity. Cells were then stimulated with 10 ng/mL of LPS in the presence or not of specific inhibitors in RPMI 1,640 medium with 2.5% FCS. After wash, cells were treated with luciferase assay kit (Promega), and luciferase activity was measured using a Tristar multimode microplate reader LB 941 (Berthold Technologies). Relative luciferase activities were normalized to protein contents.

STATISTICAL ANALYSIS

Results are representative of at least three independent experiments conducted with either THP1 cells or primary monocytes obtained from distinct donors. Statistical significance between the different values was analyzed by Student's *t*-test, with a threshold of $P < 0.05$ considered as significant.

RESULTS

LPS MODULATES THE EXPRESSION OF HS3ST ISOENZYMES IN HUMAN MONOCYTES

Prior analysis of the variations of expression of HS3STs in response to pro-inflammatory stimuli, the basal levels of expression of corresponding mRNA were quantified in non-stimulated monocytes by real-time RT-PCR. Although some inter-individual variations were found, the expression profiles of HS3STs were similar in primary monocytes from six donors, with a common higher expression of mRNA encoding HS3ST3B relative to other isoenzymes. HS3ST1, HS3ST2, and HS3ST3A were barely expressed, while other HS3STs were not detected (Fig. 1A). As expected, the expression profile of HS3STs in THP1 cells was also characterized by a high level of HS3ST3B mRNA. Additionally, these cells expressed a low level of HS3ST3A, while the expression of other isoenzymes was below the limit of detection (Fig. 1B). LPS activation (10 ng/mL) had a marked effect on the expression of HS3ST3B in both cell types. In primary monocytes, a \sim twofold increase in the level of HS3ST3B mRNA was observed at 4 h of LPS exposure, and the high expression was maintained after 16 h of stimulation. Concomitantly, the expression of HS3ST1 and HS3ST3A were modified following LPS activation, with a maximal fivefold increase by comparison with

unstimulated cells. Nevertheless, data were significant at only one time post-stimulation and the expression of both isoenzymes remained very low by comparison with HS3ST3B in LPS-stimulated cells (Fig. 1A). Similarly, a strong increase in the expression of HS3ST3B was observed in THP1 cells exposed to LPS (x9 by comparison with non-stimulated cells). The expression of HS3ST3A was also modified in LPS-stimulated cells, but the mRNA level remained low by comparison with HS3ST3B (Fig. 1B). In parallel experiments, we also analyzed whether HS2ST and HS6ST groups of HS modifying enzymes were affected by LPS stimulation in primary monocytes from the same donors (Fig. 1C) and THP1 cells (Fig. 1D). In both cases, only HS2ST1 and HS6ST1 were detected in non-stimulated cells. Following LPS activation, the levels of HS2ST1 and HS6ST1 mRNA were not significantly modified, and the expression of HS6ST2 and HS6ST3 remained not detectable. Altogether, these first results demonstrated that HS3ST3B is strongly reactive to LPS, suggesting that its gene may behave as a primary gene of the inflammatory response.

INFLAMMATORY STIMULI UP-REGULATE HS3ST3B1 GENE EXPRESSION IN HUMAN MONOCYTES

We then focused our investigation on the up-regulation of HS3ST3B by inflammatory stimuli, as it was the most responsive to LPS among HS3ST isoenzymes. In first experiments, we decided to perform time-course experiments with TLR agonists and cytokines at the following optimal concentrations: LPS, 10 ng/mL; PGN, 2 μ g/mL; TNF- α , IL-4, IL-6, and IFN- γ , 20 ng/mL, which are routinely used in the literature. At the indicated times, HS3ST3B mRNA levels were quantified by real-time RT-PCR. All stimuli caused a time-dependent increase in the expression of HS3ST3B, but the kinetic and the amplitude of the responses were quite distinct between TLR agonists and cytokines. Time-course experiments conducted with primary monocytes revealed that HS3ST3B mRNA levels increased rapidly during the first 5 h after LPS and PGN exposure and reached a \sim 15-fold induction over basal level observed in non-stimulated cells (Fig. 2A). Subsequent to this, HS3ST3B mRNA levels gradually decreased during the long times of incubation. The observation that LPS and PGN induced the same responses was not surprising, since it is well documented that both TLR agonists triggered pro-inflammatory responses in monocytes with a similar potency [Yamamoto et al., 2002]. In response to TNF- α , the profile of expression resembled the ones observed with LPS and PGN, with a rapid increase in the level of HS3ST3B mRNA during the first hours. However, the response reached a maximal fivefold induction at 4 h of stimulation, which might be explained by the lower expression of TNF- α receptors by comparison with the abundance of TLR2 and TLR4 expressed at the membrane of monocytic cells [Yoshie et al., 1986; O'Mahony et al., 2008]. Thus, these results suggested that up-regulation of HS3ST3B expression by TLR agonists and TNF- α probably involved a rapid activation of the same transcriptional mechanisms. Time-course experiments were then reproduced with IL-4, IL-6, and IFN- γ as inflammatory cytokines. Over the 24 h period of stimulation, we found that a long exposure of monocytes to IL-6 resulted in a weak increase in the expression of HS3ST3B (x 3 vs. non-stimulated cells at 16 h), while IL-4 and IFN- γ had no significant effect.

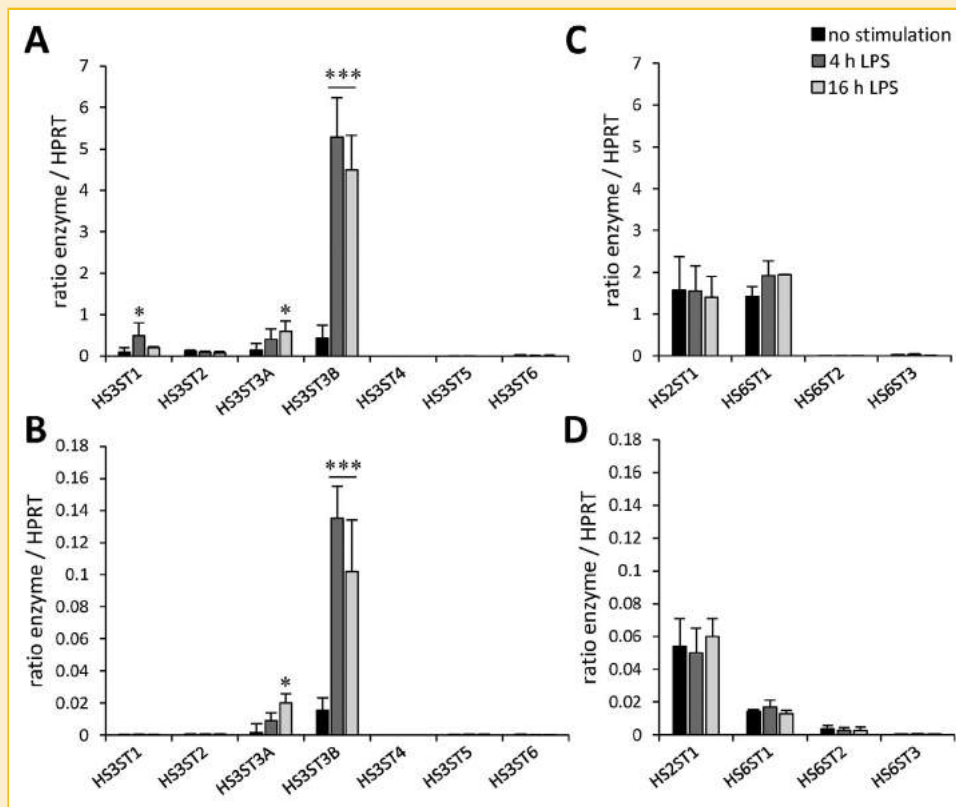


Fig. 1. Expression of HS-*O*-sulfotransferases in human primary monocytes and THP1 cells. Cells were stimulated or not in the presence with LPS (10 ng/mL) for 4 and 16 h. Following extraction of total RNA and reverse transcription, the expression of HS3ST, HS2ST, and HS6ST isoenzymes was analyzed in triplicates by real-time PCR, as described in "Materials and Methods." Relative mRNA abundance was normalized to endogenous HPRT mRNA. Data are means \pm S.D. of six independent experiments conducted with monocytes from distinct donors (A, C) and from three separate independent experiments with THP1 cells (B, D). (* and ***, significantly different by comparison with non-stimulated cells, $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively).

As observed in primary monocytes, the level of HS3ST3B mRNA increased rapidly in THP1 cells during the first hours of LPS and PGN stimulation ($\times 8$ vs. non-stimulated cells), and decreased steadily thereafter (Fig. 2A). TNF- α also induced a rapid increase in the level of HS3ST3B mRNA, which remained however weaker than the ones obtained with TLR agonists ($\times 3$ vs. non-stimulated cells). Finally, we found that the profiles of HS3ST3B expression were similar for the three cytokines. Increase in the level of HS3ST3B was no more than twice the basal level and maximal induction was observed after 8 h of stimulation, confirming that these cytokines are poor inducers of HS3ST3B expression when compared to TLR agonists and TNF- α . Thus, the expression profiles of HS3ST3B mRNA in stimulated primary monocytes and THP1 cells resembled each other. These results indicate that HS3ST3B overexpression has involved common signaling pathways in primary monocytes and THP1 cells, and also validate the use of the immortalized cell line for further mechanistic studies.

To check that the expression of HS3ST3B to inflammatory stimuli is dose-dependent, THP1 cells were stimulated for 8 h with various concentrations of either LPS, PGN, and the cytokines TNF- α , IL-6, IL-4, or IFN- γ , after which HS3ST3B mRNA were quantified by real-time RT-PCR (Fig. 2B). All treatments induced a dose-dependent increase in the level of HS3ST3B mRNA, even though cytokines triggered a moderate effect when compared to LPS and PGN. Indeed,

both TLR agonists induced a \sim sevenfold increase in the expression of the enzyme, while a maximal threefold induction was only observed with cytokines in these experiments. High expression of HS3ST3B was observed from 1 ng/mL of LPS and 1 μ g/mL of PGN, which was consistent with the concentrations of TLR agonists routinely used to induce a full expression of pro-inflammatory genes in monocytes. In addition, the maximal effect of cytokines was observed from 20 ng/mL of each. Increasing their concentrations did not modify the amplitude of the responses, thus confirming that cytokines are poor inducers of HS3ST3B expression by comparison with TLR agonists.

INFLAMMATORY STIMULI INCREASE THE PRODUCTION AND ACTIVITY OF HS3ST3B IN HUMAN MONOCYTES

In order to confirm that increase in the level of HS3ST3B mRNA led to changes in the production of the corresponding enzyme, we performed Western blot experiments with lysates from THP1 cells stimulated for 24 h with inflammatory stimuli. As shown in Figure 3A, HS3ST3B was immunostained in lysate from non-stimulated THP1 cells and higher expression was detected after LPS and PGN stimulation. Conversely, no notable modification in the production of HS3ST3B could be observed in response to TNF- α , IL-4, IL-6, and IFN- γ (data not shown), which could be related to the slight increase in gene transcription induced by the cytokines.

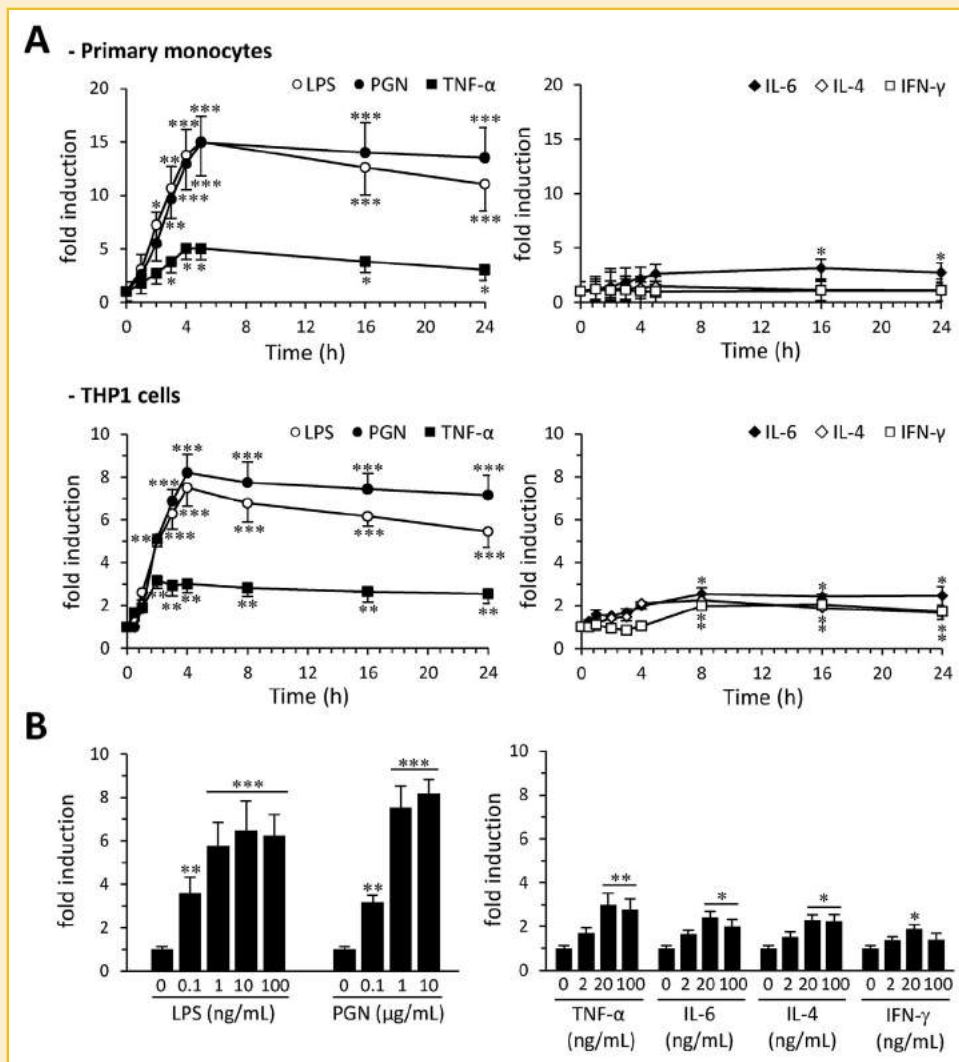


Fig. 2. Time- and dose-dependent effects of inflammatory stimuli on the expression of HS3ST3B mRNA in human primary monocytes and THP1 cells. (A) Cells were stimulated with either LPS (10 ng/mL) (○), PGN (2 μg/mL) (●), TNF-α (20 ng/mL) (■), IL-6 (20 ng/mL) (◆), IL-4 (20 ng/mL) (◇), or IFN-γ (20 ng/mL) (□). At the indicated times, cells were harvested and real-time RT-PCR were performed to quantify HS3ST3B and HPRT mRNAs. Results are expressed as the relative expression of HS3ST3B mRNA compared with that obtained in non-stimulated cells. Each experiment was repeated three times with monocytes obtained from distinct donors and three times with THP1 cells. Data are means ± S.D. of these independent experiments. (B) THP1 Cells were stimulated with increasing concentrations of TLR agonists (LPS, PGN) or cytokines (TNF-α, IL-6, IL-4, or IFN-γ) for 8 h prior analysis of the levels of HS3ST3B transcript by real-time RT-PCR. Results are expressed as mean values ± S.D. of three separate experiments and represent fold changes by comparison with non-stimulated cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. non-stimulated cells).

In next experiments, flow cytometric analysis was performed with anti-HS epitope antibody to check that HS 3-*O*-sulfation was modified by the increased expression of HS3ST3B. To this end, THP1 cells were stimulated with TLR agonists and cytokines for 24, 48, and 72 h and immunostained with HS4C3 antibody, which recognizes highly sulfated HS epitopes containing 3-*O*-sulfate groups [Deligny et al., 2010; Martinez et al., 2015]. As shown in Figure 3B, HS4C3 efficiently stained non-activated THP1 cells, and stimulation with LPS or PGN enhanced the cell surface binding of the antibody. By comparison with TLR agonists, cytokines were less efficient to modify the reactivity of anti-HS antibody. Indeed, cell immunostaining was only twofold increased at 72 h post-stimulation with TNF-α and other cytokines, while a fivefold

increase was observed in the presence of TLR agonists at the same time (Fig. 3C). Taken together, these results are informative of the changes in HS sulfation induced by TLR agonists and cytokines, and indicate that increased expression of HS3ST3B may in turn lead to a higher density of 3-*O*-sulfate groups in HS of activated monocytes.

UP-REGULATION OF *HS3ST3B1* GENE EXPRESSION IS DEPENDENT ON THE ACTIVATION OF NF-κB AND MAPK SIGNALING PATHWAYS

LPS and PGN are well-known inducers of pro-inflammatory responses, acting via the activation of various intracellular signaling pathways. The main signaling events include NF-κB pathway and MAPK cascades, which culminate in the activation of ERK, JNK, and p38 MAPK [Szatmary, 2012]. To know whether these pathways are

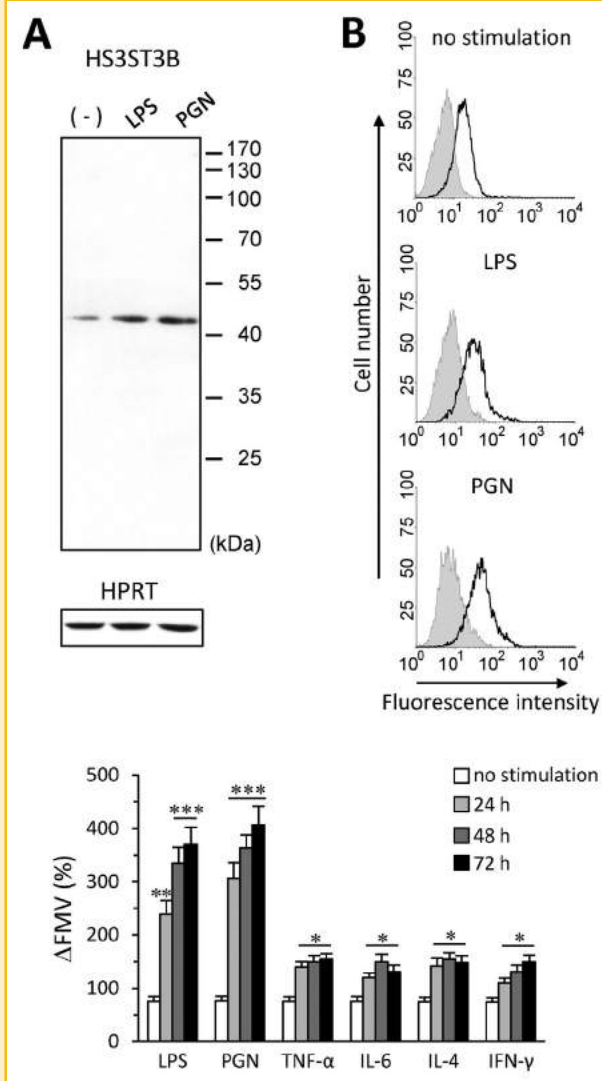


Fig. 3. Effect of inflammatory stimuli on HS3ST3B production and HS 3-*O*-sulfation. (A) Immunostaining of endogenous HS3ST3B in THP1 cells. Following a 24 h-exposure to either LPS or PGN, variations in the expression of HS3ST3B were analyzed in cell lysates by Western blot. The apparent molecular weight of the unique reactive band was ~43 kDa. Detection of HPRT confirmed equal loading of samples. Representative results from three independent experiments are shown. (B) Immunostaining of cell surface HS by HS4C3 antibody. Following exposure to LPS or PGN for 72 h, THP1 cells were immunostained with antibody to HS epitope or isotype control. The black line histograms represent staining with HS4C3 antibody and the gray histograms represent negative control obtained with MPB49 isotype control antibody. Data are representative of three separate experiments. (C) Surface binding of HS4C3 antibody to THP1 cells in response to TLR agonists and cytokines. Cells were incubated with either LPS (10 ng/mL), PGN (2 μg/mL), TNF-α, IL-6, IL-4, or IFN-γ (20 ng/mL). At the indicated times, cells were harvested and immunostained with HS4C3 or isotype control antibodies. Results are expressed as variation of fluorescence mean value (ΔFMV%) and correspond to means ± S.D. from at least three separate experiments. (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs. non-stimulated cells).

required for the up-regulation of HS3ST3B expression, THP1 cells were pretreated for 1 h with specific inhibitors prior stimulation with LPS. The inhibitors used are: JNK inhibitor II (1 μM), U0126 (5 μM), and SB203580 (5 μM) to block JNK, ERK, and p38 MAPK activations, respectively, and IKK inhibitor III (10 μM), which inhibits IκBα phosphorylation and proteosomal degradation, thus leading to a consequent inhibition of NF-κB activation. As shown above (Fig. 2A), the expression of HS3ST3B increased rapidly during the first 5 h of culture after LPS exposure. Subsequent to this rapid phase of induction, HS3ST3B mRNA level decreased gradually during the long times of incubation. Thus, we decided to measure the effects of the inhibitory drugs at 4 and 16 h LPS post-stimulation (Fig. 4). In the absence of LPS stimulus, the levels of HS3ST3B mRNA were not significantly affected by the treatment with inhibitors. At 4 h post-stimulation, IKK inhibitor III strongly suppressed LPS-induced HS3ST3B expression on THP1 cells, thus indicating that NF-κB activation was critically required for enhancing rapid transcription of the gene encoding HS3ST3B. JNK and p38 MAPK inhibitors were also efficient to reduce HS3ST3B expression induced by a 4 h LPS exposure (~50% and ~35% of inhibition with JNK inhibitor II and SB203580 respectively, when compared to the level obtained in the absence of inhibitors). In contrast, increase in the expression of HS3ST3B was refractory to inhibition by the ERK inhibitor U0126. After 16 h of LPS stimulation, the effect of inhibitory drugs targeting p38 MAPK and NF-κB were more pronounced, and the administration of U0126 was also efficient to inhibit the increase in HS3ST3B expression (45% of inhibition by comparison with the level of HS3ST3B mRNA obtained in the absence of inhibitors). Taken together, these results support a model in which up-regulation of HS3ST3B expression could be biphasic, with a rapid phase of induction dependent on NF-κB, JNK, and p38 MAPK activation, and a second phase in the course of which ERK activation complements the first signaling events to maintain a steady state of HS3ST3B mRNA level in stimulated THP1 cells.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF *HS3ST3B1* GENE PROMOTER

In order to study the transcriptional regulation of *HS3ST3B1* gene, a genomic fragment spanning 2,140 bp from the positions -1900 to +240 of the putative transcription start site (TSS) was cloned upstream of the firefly luciferase reporter gene in a pGL3-basic vector, as described in the experimental section. The putative TSS of the gene was positioned by using the transcript no. AK023723 (GenBank accession number), which has the longer 5' extension among transcript sequences encoding HS3ST3B. As expected, this 2,140 bp sequence includes the putative *HS3ST3B1* gene promoter region, which was predicted by using Genomatix Model Inspector software [Quandt et al., 1995]. The resulting pGL3prHS3ST3B1 construct was transfected in THP1 cells and time-course experiments were performed to compare the behavior of the reporter gene with the endogenous gene encoding HS3ST3B (Fig. 5A). In the absence of stimulus, luciferase activity in THP1 transfected with pGL3prHS3ST3B1 construct was found ~ninefold higher than the basal activity of pGL3-basic vector (used as a control of backbone-based luciferase activity) and remained unchanged during the time-course experiment. As expected, LPS had no enhancing effect on the basal luciferase activity in THP1 cells transfected with

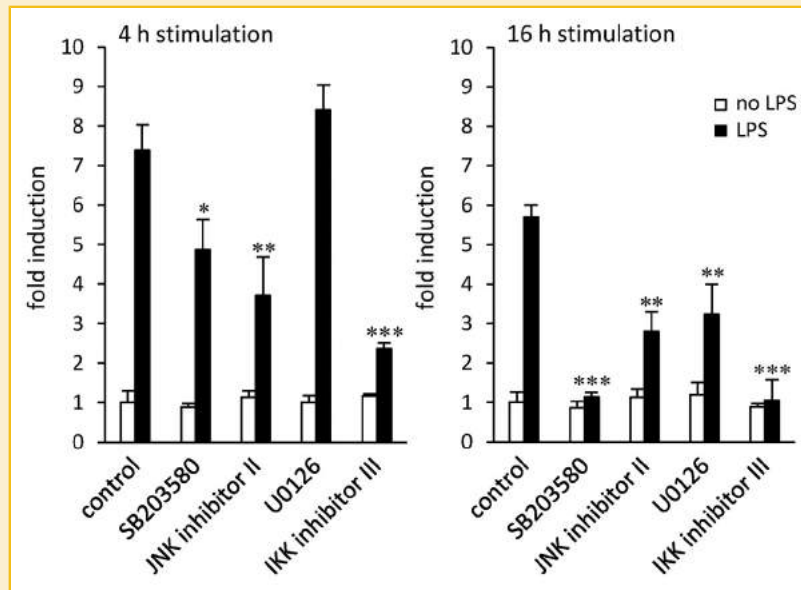


Fig. 4. Effect of specific inhibitors of signaling molecules on LPS-induced overexpression of HS3ST3B. THP1 cells were either untreated (control) or pretreated for 1 h with specific inhibitors to p38 MAPK (SB203580), JNK (JNK inhibitor II), ERK (U0126), or NF- κ B (IKK inhibitor III). Thereafter, cells were either non-stimulated (open bars) or stimulated with LPS (10 ng/mL) (filled bars) for 4 and 16 h. Variations in the levels of HS3ST3B mRNA were quantified by real-time RT-PCR. Relative mRNA abundance was normalized to endogenous HPRT mRNA. Results are expressed as fold changes by comparison with non-stimulated cells cultured in the absence of inhibitory drug and correspond to means \pm S.D. from three separate experiments (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, significantly different by comparison with LPS-stimulated cells in the absence of inhibitors).

pGL3-basic vector. In THP1 cells transfected with pGL3prHS3ST3B1 construct, luciferase activity increased rapidly during the first 4 h of LPS stimulation and reached a plateau thereafter. These results confirmed that the putative promoter region contained functional elements for both constitutive and LPS-induced transcriptional

activity. To ascertain that the reporter gene was as reactive as the gene encoding HS3ST3B, transfected THP1 cells were pretreated with NF- κ B and MAPK inhibitors prior LPS stimulation for 4 and 16 h (Fig. 5B). As expected, the inhibitory drugs did not significantly modify luciferase activity in the absence of LPS. In contrast,

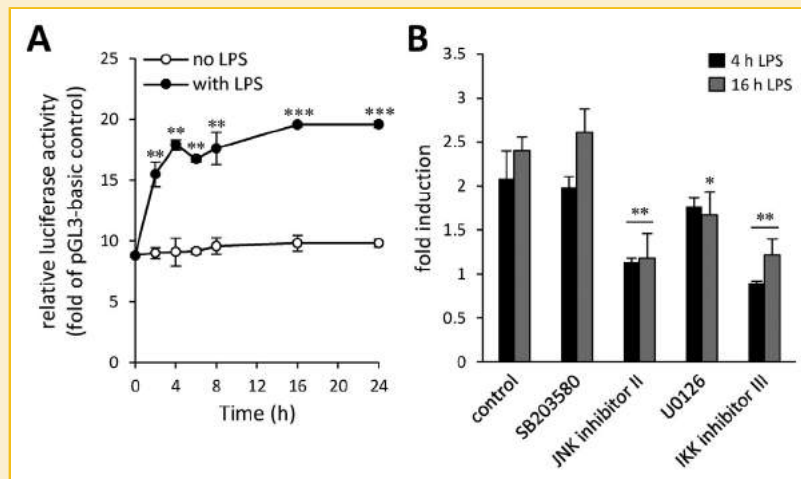


Fig. 5. Functional analysis of the *HS3ST3B1* gene promoter in THP1 cells. Cells were transfected with either the *HS3ST3B1* promoter luciferase reporter construct (pGL3prHS3ST3B1) or empty vector (pGL3-basic) for 18 h, after which time they were stimulated or not in the presence of LPS. (A) Time-course variations in luciferase activity driven by human *HS3ST3B1* promoter in the presence (●) or absence (○) of LPS. Transfected cells were harvested at the indicated times and luciferase activity was assayed. Data were normalized to the protein content and expressed as luciferase activity driven by pGL3prHS3ST3B1 relative to that of empty pGL3-basic vector. Results are means \pm S.D. from three separate experiments. (B) Effects of specific inhibitors to signaling pathways on the luciferase activity. Transfected cells were pretreated for 1 h with inhibitors prior LPS administration for 4 or 16 h. Relative luciferase activity is calculated as fold induction over that of non-stimulated cells. Data are mean values \pm S.D. of three separate experiments (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, significantly different by comparison with LPS-stimulated cells in the absence of inhibitors).

exposure to LPS induced a twofold increase in luciferase activity when compared to non-stimulated cells. This response was strongly reduced by inhibitory drugs targeting NF- κ B and JNK, thus confirming that up-regulation of HS3ST3B expression is highly dependent on the activation of these signaling pathways. In contrast, U0126 had a moderate inhibitory effect, indicating that ERK had only a minor effect in the transcriptional events controlling HS3ST3B expression. Most surprisingly, we found that targeting p38 MAPK with the inhibitory drug SB203580 had no effect on luciferase activity at 4 or 16 h post-stimulation, while it was efficient to inhibit the increase in HS3ST3B mRNA in LPS-stimulated cells (Fig. 5B). Altogether, these results support a model in which NF- κ B and JNK are critically involved in the early activation of transcriptional mechanisms controlling HS3ST3B expression, while p38 MAPK activation could be required in a post-transcriptional regulatory process.

LPS-INDUCED EXPRESSION OF HS3ST3B IS CONTROLLED BY DE NOVO PROTEIN SYNTHESIS

A common feature of many primary response genes is the observation that translational inhibitors such as CHX paradoxically increase mRNA expression, a phenomenon called super-induction. The underlying mechanisms would be related to inhibition of the synthesis of regulatory proteins involved in the negative control of gene transcription and/or stabilization of mRNA. To examine whether CHX may affect LPS-induced HS3ST3B expression in the same way, THP1 cells were pretreated with CHX (10 μ g/mL) or not for 1 h prior LPS stimulation and the levels of mRNA were quantified by real-time RT-PCR at 4 and 16 h post-stimulation. In the presence of the inhibitory drug, we found that the levels of HS3ST3B mRNA was 28-fold and 19-fold increased by comparison to non-stimulated cells, while it was only increased by nine and six in cells exposed to LPS alone at the same times, thus reflecting a \sim threefold super-induction (Fig. 6A). Thus, the effect observed with CHX suggested that LPS-induced HS3ST3B expression could be regulated by de novo synthesized proteins acting at the transcriptional and/or post-transcriptional levels. To investigate the relative contribution of both mechanisms, a real-time RT-PCR strategy was used to distinguish between nascent HS3ST3B transcripts (hnRNA) and HS3ST3B mRNA. We found that LPS induced a 5.5-fold increase in the level of HS3ST3B hnRNA when compared to non-stimulated cells. Most interestingly, a 16.5-fold increase was obtained after CHX treatment, indicating that inhibition of protein synthesis led to an almost threefold higher expression of HS3ST3B hnRNA by comparison with control cells exposed to LPS alone (Fig. 6B). Given that CHX induced a similar increase in the levels of hnRNA and mRNA, this indicates that super-induction observed with CHX primarily occurred via increased *HS3ST3B1* gene transcription. However, we cannot exclude that inhibition of post-transcriptional mechanisms may also explain, at least in part, the super-inductive effect of CHX.

LPS-INDUCED EXPRESSION OF HS3ST3B IS REGULATED BY POST-TRANSCRIPTIONAL MECHANISMS

We demonstrated that p38 MAPK activation did not participate in the transcriptional regulation of the gene encoding HS3ST3B. The 3' untranslated region (3'UTR) of many mRNA encoding inflammatory

mediators has been described to be targeted by regulatory proteins, which control their stability and/or translation. These RNA-binding proteins can be regulated by various signaling molecules, including p38 MAPK [Palanisamy et al., 2012]. Given that the pGL3prHS3ST3B1 construct lacks the 3'UTR of the endogenous *HS3ST3B1* gene, this may explain why luciferase activity from transfected THP1 cells exposed to LPS was not affected by the inhibitory drug targeting p38 MAPK. To test this hypothesis, the stability of endogenous HS3ST3B mRNA was monitored in THP1 cells by actinomycin D pulse chase. To this end, THP1 cells were exposed to LPS for 4 h and thereafter treated with actinomycin D for a 3 h incubation, in the course of which the levels of HS3ST3B mRNA were measured at the indicated time points by real-time RT-PCR (Fig. 7). As expected, the expression of HS3ST3B mRNA was strongly increased in response to LPS (x 9 when compared to non-stimulated cells). Concomitantly, the half-life ($T_{1/2}$) of HS3ST3B mRNA was reduced from 270 min in non-stimulated cells to 115 min in LPS-stimulated cells. These results suggest that post-transcriptional mechanisms probably counterbalanced the transcriptional activation of the gene encoding HS3ST3B, in order to maintain a steady state of mRNA level in stimulated THP1 cells. As shown above, the addition of p38 MAPK inhibitor SB203580 prior LPS stimulation resulted in a decrease in the level of HS3ST3B mRNA. We found here that the inhibitory effect of the drug was also accompanied by a reduced $T_{1/2}$ of the transcripts (81 min), thus indicating that p38 MAPK certainly plays a critical role in the mechanisms controlling the stability of HS3ST3B mRNA.

As demonstrated above, cell treatment with CHX prior the addition of LPS increased the levels of hnRNA and mRNA, which indicates that de novo synthesized proteins would be involved in the down-regulation of *HS3ST3B1* gene transcription. However, these results did not exclude the possibility that inhibition of mRNA degradation may also account for the super-inductive effect of CHX. To test this possibility, THP1 cells were pretreated with CHX prior stimulation with LPS, and the stability of HS3ST3B mRNA was analyzed as above. We found that the addition of CHX increased the $T_{1/2}$ of HS3ST3B mRNA to 158 min, which was in line with the higher level of HS3ST3B mRNA in the same cells. Thus, CHX probably inhibited the synthesis of regulatory proteins, which are involved in the degradation of HS3ST3B mRNA in LPS-stimulated cells. Altogether, these observations suggest that the high expression of HS3ST3B in activated THP1 cells is also controlled by a post-transcriptional mechanism, in which the opposing effects of p38 MAPK and de novo synthesized proteins maintained mRNA level to a steady state.

DISCUSSION

HS is recognized as an important player in a wide range of dynamic steps of inflammatory reactions, including the binding and accumulation of many cytokines and growth factors in the appropriate location to encounter their target cells and to facilitate the assembly with cognate signaling receptors [Zhang, 2010; Sarrazin et al., 2011; Mortier et al., 2012]. Thereby, structural remodeling of HS is likely to play an important role in the

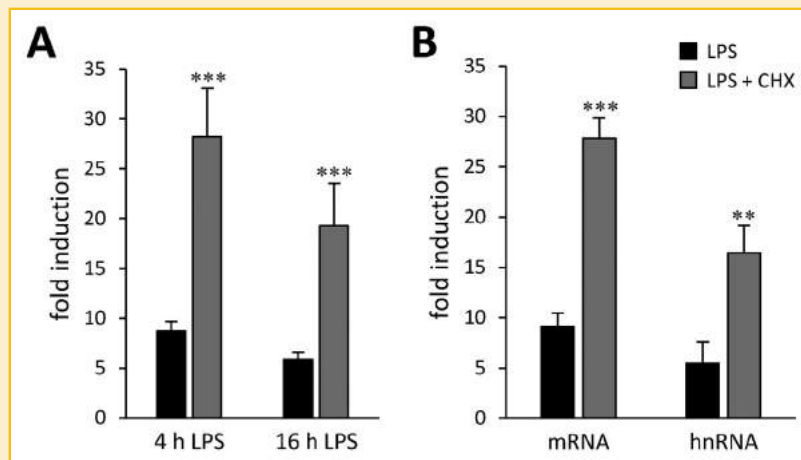


Fig. 6. Effect of cycloheximide on the expression of HS3ST3B in LPS-stimulated THP1 cells. Cells were pretreated or not with CHX for 1 h prior LPS stimulation. (A) After 4 or 16 h LPS exposure, cells were harvested and real-time RT-PCR was performed to quantify HS3ST3B mRNA. Data are expressed as fold changes in HS3ST3B mRNA by comparison with non-stimulated cells cultured in the absence of CHX ($n = 3$ separate experiments). (B) Cells were pretreated or not for 1 h with CHX followed by treatment with LPS for 4 h. The expression of HS3ST3B mRNA and hnRNA was analyzed by real-time RT-PCR. Data are means \pm S.D from three independent experiments and results are expressed as fold changes by comparison with non-stimulated cells cultured in the absence of CHX (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different by comparison with THP-1 stimulated with LPS alone).

regulation of inflammatory and immune responses. An important modulator of HS structure is heparanase, which has been well described to participate in many inflammatory processes via the degradation of HS, both in extracellular space and at the cell surface [Nasser, 2008; Meirovitz et al., 2013]. Upstream the action of heparanase, fine regulation of the biosynthesis machinery could be a way to make HS with distinct inflammatory functions.

Nevertheless, only a few studies have taken an interest in the regulation of HS biosynthetic enzymes in the course of an inflammatory response. By using a mouse model with inactivated NDST1 gene, Wang et al. [2005] showed that endothelial cells are defective in their response to inflammatory stimuli. This observation was supporting the idea that enzymatic modifications of HS *N*-sulfation could alter the communication between inflammatory

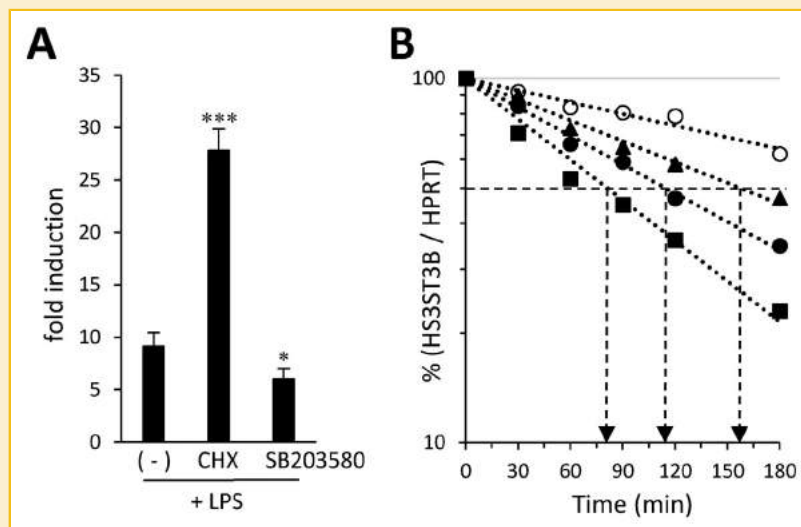


Fig. 7. Analysis of HS3ST3B mRNA stability in THP1 cells stimulated or not with LPS. Cells were pretreated or not with p38 MAPK inhibitor or CHX for 1 h prior LPS stimulation. At 4 h post-stimulation, actinomycin D was added to stop any further mRNA synthesis and the cells were incubated for a further 3 h pulse chase. (A) Prior addition of actinomycin D, cells were harvested and real-time RT-PCR was performed to quantify HS3ST3B mRNA levels in each conditions at the 0 min point of the time-course experiment. Results are expressed as fold changes by comparison with non-stimulated cells (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different by comparison with LPS-stimulated cells in the absence of inhibitors). (B) At the indicated times, remaining HS3ST3B mRNA were quantified by real-time RT-PCR and the results are normalized to 100% at the 0 min point: no stimulus (○); LPS (●); LPS + SB203580 (■); LPS + CHX (▲). The results are representative of three separate experiments.

cells and their environment. In this regard, we and others reported that the expression of NDST1 and NDST2 was increased in macrophages and endothelial cells as a response to pro-inflammatory stimuli, which was related to changes in the *N*-sulfation pattern of cell surface HS [Carter et al., 2003; Krenn et al., 2008; Martinez et al., 2015]. In addition to NDSTs, HS3STs have been also reported to be responsive to an inflammatory environment. As example, down-regulation of HS3ST1 in endothelial cells was described as a consequence of the stimulation by TNF- α and LPS. Given that HS3ST1 is a key enzyme for the generation of the binding site for AT-III, the authors suggested that the consequent HS modifications could participate in the activation of the coagulation system [Krenn et al., 2008]. More recently, we demonstrated that M1 polarization of macrophages by the combination of LPS and IFN- γ strongly induced the expression of HS3ST3B. In contrast, HS3ST1 and HS3ST2 were highly expressed in response to M2 polarization by IL-4/IL-13, while they were barely detected in M1 macrophages [Martinez et al., 2015]. These observations suggest that the expression of HS3STs may be differentially regulated as a response to the modifications of the inflammatory environment. However, little is known about the molecular mechanisms that control the expression of these biosynthetic enzymes. In the current work, we have then examined in detail the regulation of HS3ST3B in activated monocytes. In a first set of experiments, we demonstrated that LPS activation strongly increased the expression of HS3ST3B in primary monocytes and THP1 cells, while other HS3STs, HS2ST1 and HS6STs were either moderately affected or not responsive. We then examined whether other inflammatory stimuli were as efficient as LPS to induce changes in the expression of HS3ST3B. The level of HS3ST3B mRNA was rapidly increased in response to LPS, PGN, and TNF- α , with a maximal induction peaking at 4 h post-stimulation. LPS and PGN appeared \sim three times more potent than TNF- α , which may be due to the high expression of TLR2 and TLR4 at the membrane of monocytes by comparison with TNF- α receptors [Yoshie et al., 1986; O'Mahony et al., 2008]. In contrast, IL-4, IL-6, and IFN- γ induced a slight increase in the expression of HS3ST3B with a delayed induction peaking at 8 h post-stimulation. Finally, we demonstrated that high levels of HS3ST3B mRNA in LPS or PGN-activated THP1 cells was accompanied by an increase in the expression of corresponding enzyme and modification in the density of 3-*O*-sulfate groups in cell surface HS. Altogether, these results indicate that TLR agonists are potent inducers of HS3ST3B expression and activity, which in turn lead to the generation of 3-*O*-sulfated HS as a consequence of inflammatory activation.

To decipher the molecular mechanisms that cause an over-expression of HS3ST3B in activated monocytes, specific inhibitory drugs were used to target the main signaling cascades activated by pro-inflammatory stimuli. First, we demonstrated that NF- κ B, JNK, and p38 MAPK were critically required for a rapid and full expression of HS3ST3B. In contrast, the dependence on ERK signaling was delayed, which led us to suggest that up-regulation of HS3ST3B expression could be a biphasic process, with early events controlling a rapid increase in the level of HS3ST3B mRNA followed by a phase corresponding to a steady state. To gain insight into the

transcriptional activation of *HS3ST3B1* gene, we decided to construct the pGL3prHS3ST3B1 reporter gene, in which the gene encoding luciferase was under the control of *HS3ST3B1* promoter. To this end, the sequence corresponding to the putative *HS3ST3B1* promoter was analyzed by using Genomatix MatInspector and AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com>) softwares. In silico analysis of the predicted sequence revealed that *HS3ST3B1* gene possesses a TATA-less promoter containing classical core promoter elements, which are required for effective transcription. It also contains several GC-boxes, considered as consensus sites for the transcription factor Sp1. Interestingly, the combination of these features has been already described in *XYLT1*, *XYLT2*, and *EXT1* genes, which encode enzymes involved in initiation and elongation steps of HS biosynthesis [Müller et al., 2009, 2013; Jennes et al., 2012]. Moreover, the absence of classical TATA-box and the presence of GC-boxes are often encountered within housekeeping gene promoters [Zhu et al., 2008], which is in agreement with the broad expression of these HS biosynthetic enzymes. In addition to *cis*-binding elements for basal/general transcription factors, the putative *HS3ST3B1* promoter also contained sequences identified as binding sites for NF- κ B, C/EBPs, CREB, and AP1/c-jun, which are transcription factors classically activated by inflammatory stimuli [Guha and Mackman, 2001; Zhou et al., 2003; Lu et al., 2009]. As expected, time-course activation of pGL3prHS3ST3B1 construct and endogenous gene encoding HS3ST3B resembled each other, indicating that the predicted promoter was functional in our model. Moreover, inhibition of NF- κ B and JNK pathways strongly reduced LPS-induced luciferase activity, while the effect of ERK inhibitor was moderate. These results support a model in which LPS-induced *HS3ST3B1* gene transcription is critically dependent on NF- κ B and JNK activation. This is also consistent with the in silico analysis of the putative *HS3ST3B1* promoter. Indeed, we identified three *cis*-binding elements for NF- κ B, which may explain the high inhibition obtained with the drug targeting this transcription factor. In addition, JNK activation has been described as a key event for the transcriptional activity of CREB and AP1/c-jun in response to inflammatory stimuli [Boehlk et al., 2000; Diaz and Lopez-Berestein, 2000]. Additional experiments are currently in progress to confirm the binding of these transcription factors to the predicted *cis*-elements in *HS3ST3B1* gene promoter.

More surprisingly, we found that inhibition of p38 MAPK pathway had no notable effect on luciferase activity, whereas the mRNA level of HS3ST3B mRNA was significantly reduced by the same inhibitory drug. These results led us to postulate that p38 MAPK could be required to regulate post-transcriptional mechanisms. Indeed, active p38 MAPK was previously described to control the mRNA stability of many inflammatory mediators through activation of the kinase MK2, which subsequently phosphorylates and inactivates the protein TTP. Once inactivated, phosphorylated TTP dissociates from the 3'UTR of mRNA, leading to an enhancement of its stability [Neininger et al., 2002; Zhao et al., 2011; Palanisamy et al., 2012]. Consequently, the lack of the sequence corresponding to the 3'UTR of HS3ST3B mRNA in our reporter gene may explain why luciferase activity was not affected by the inhibitory drug targeting p38 MAPK. To check this possibility, we analyzed the half-life of HS3ST3B mRNA in LPS-stimulated THP1 cells. We found that

inhibition of p38 MAPK was accompanied by a ~1.5 fold reduction in the $T_{1/2}$ of HS3ST3B mRNA, which is in accordance with the lowered level of the transcript in treated cells. Thus, these results support the idea that p38 MAPK takes part in the regulation of HS3ST3B expression by directing post-transcriptional events that enhance stability of the transcripts.

In next experiments, we addressed the possibility that over-expression of HS3ST3B could be regulated by inducible proteins. Surprisingly, we found that translational blockage by CHX did not reduce LPS-induced expression of HS3ST3B mRNA but rather led to a super-induction. Indeed, we observed that CHX induced an increase in the levels of both hnRNA and mRNA in LPS-treated cells, indicating that the drug has probably blocked transcriptional processes involved in the negative regulation of HS3ST3B expression. One explanation may be that CHX has inhibited the synthesis of transcriptional inhibitors. We have seen that HS3ST3B over-expression was highly dependent on the activation of NF- κ B. It is now well established that LPS-induced NF- κ B activation can be down-regulated by a number of negative feedback systems, which have evolved to reduce the production of pro-inflammatory mediators. These include de novo expression of LPS-inducible members of the I κ B family, such as Bcl-3 and I κ B ζ , and resynthesis of I κ B α , which are produced with delayed kinetic and target NF- κ B dependent gene expression [MaruYama, 2015]. Consequently, NF- κ B remains fully active in the absence of these transcriptional inhibitors, which may explain the super-inductive effect of CHX on HS3ST3B expression. On the other hand, we found that treatment by CHX caused a marked increase in the half-life of HS3ST3B mRNA, supporting the idea that CHX has inhibited a post-transcriptional system that normally control the level of transcripts by enhancing their degradation. Such a stabilizing effect of CHX have been already described for a number of mRNAs induced by inflammatory stimuli, including the transcripts of COX-2, iNOS, ICAM-1, GM-CSF, IL-6, and IL-8 [Wertheimer et al., 1992; Xing et al., 1993; Evans et al., 1994; Newton et al., 1997; Roger et al., 1998; Hershko et al., 2004]. These last results indicate that high level of HS3ST3B mRNA in activated cells is also controlled by post-transcriptional mechanisms, in which the stabilizing effect of p38 MAPK is counter-balanced by an inducible system that enhances mRNA degradation.

It is worthy to note that among the mRNA sequences registered in GenBank and corresponding to HS3ST3B transcripts, the accession number BC063301 is approximately 5.3 kb in length and contains an extensive 3'UTR of ~3.8 kb. Such a large 3'UTR is a common hallmark of many transcription products induced by inflammatory stimuli, in which post-transcriptional events control mRNA stability and/or translation. They are all characterized by the presence of AU-rich elements (AREs), which are targeted by ARE-binding proteins such as TTP, AUF1, and HuR [Barreau et al., 2006]. Depending on their arrangement, AREs have been ranked among three classes. Class I AREs contains sequences with non-overlapping AUUUA pentamers. They are found in the 3'UTR of mRNAs encoding transcription factors and cytokines, such as c-fos, c-myc, IL-4, and IL-6. In contrast, class II AREs contain multiple overlapping AUUUA motifs and are representative of cytokines with rapid mRNA decay, such as TNF- α and GM-CSF. Finally, AREs in which AU-rich sequences are not organized in AUUUA pentamers have been ranked

in a class III. Such sequences are situated within the 3'UTR of c-jun and IL-8 mRNAs [Stoecklin et al., 2001; Frevel et al., 2003; Barreau et al., 2006; Palanisamy et al., 2012]. Because our results suggest a post-transcriptional regulation of HS3ST3B mRNA, we examined whether the 3'UTR of BC063301 sequence contains AU-rich motifs. In silico analysis of the full length of 3'UTR allowed us to identify eight scattered sequences with no overlapping pentanucleotide AUUUA core motifs, suggesting that the 3'UTR of HS3ST3B mRNA contains a class I ARE. This is consistent with the long half-life of HS3ST3B mRNA, since class I AREs have been reported to stabilize mRNAs induced by inflammatory stimuli [Frevel et al., 2003].

Collectively, our results provide evidence that *HS3ST3B1* gene can be considered as a primary response gene. Indeed, it shares the main features of this gene family, i.e., mRNA expression peaking at ~2–4 h, dependence on first class transcription factors that are constitutively expressed, such as NF- κ B, and requirement of active MAPKs [Medzhitov and Horng, 2009]. Moreover, we demonstrated that HS3ST3B expression is controlled by transcriptional and post-transcriptional mechanisms, which is a common hallmark of many inflammatory and immune gene products. In this context, it can be hypothesized that HS3ST3B is involved in the synthesis of 3-O-sulfated HS with specific functions in the regulation of inflammatory and immune responses. This aspect will be the subject of upcoming studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Université de Lille 1, France. 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-HS4C3 antibodies.

REFERENCES

- Aikawa J, Grobe K, Tsujimoto M, Esko JD. 2001. Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, ND ST4. *J Biol Chem* 276:5876–5882.
- Barreau C, Paillard L, Osborne HB. 2006. AU-rich elements and associated factors: Are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33:7138–7150.
- Boehlk S, Fessele S, Mojaat A, Miyamoto NG, Werner T, Nelson EL, Schlöndorff D, Nelson PJ. 2000. ATF and Jun transcription factors, acting through an Ets/CRE promoter module, mediate lipopolysaccharide inducibility of the chemokine RANTES in monocytic Mono Mac 6 cells. *Eur J Immunol* 30:1102–1112.
- Brusilovsky M, Cordoba M, Rosental B, Hershkovitz O, Andrade MD, Pecherskaya A, Einarson MB, Zhou Y, Braiman A, Campbell KS, Porgador A. 2013. Genome-wide siRNA screen reveals a new cellular partner of NK cell receptor KIR2D L4: Heparan sulfate directly modulates KIR2DL4-mediated responses. *J Immunol* 191:5256–5267.
- Carter NM, Ali S, Kirby JA. 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.
- Celie JW, Beelen RH, van den Born J. 2009. Heparan sulfate proteoglycans in extravasation: Assisting leukocyte guidance. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:4932–4949.
- 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.
- Diaz B, Lopez-Berestein G. 2000. A distinct element involved in lipopolysaccharide activation of the tumor necrosis factor- α promoter in monocytes. *J Interferon Cytokine Res* 20:741–748.
- Esko JD, Selleck SB. 2002. Order out of chaos: Assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* 71:435–471.
- Evans T, Carpenter A, Cohen J. 1994. Inducible nitric-oxide-synthase mRNA is transiently expressed and destroyed by a cycloheximide-sensitive process. *Eur J Biochem* 219:563–569.
- Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, Eriksson I, Ledin J, Hellman L, Kjellén L. 1999. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* 400:773–776.
- Frevel MA, Bakheet T, Silva AM, Hissong JG, Khabar KS, Williams BR. 2003. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol Cell Biol* 23:425–436.
- Götte M, Spillmann D, Yip GW, Versteeg E, Echtermeyer FG, van Kuppevelt TH, Kiesel L. 2008. Changes in heparan sulfate are associated with delayed wound repair, altered cell migration, adhesion, and contractility in the galactosyltransferase I (beta4GalT-7) deficient form of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mol Genet* 17:996–1009.
- Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85–94.
- Hershko DD, Robb BW, Wray CJ, Luo GJ, Hasselgren PO. 2004. Superinduction of IL-6 by cycloheximide is associated with mRNA stabilization and sustained activation of p38 map kinase and NF- κ B in cultured caco-2 cells. *J Cell Biochem* 91:951–961.
- Jennes I, Zuntini M, Mees K, Palagani A, Pedrini E, De Cock G, Fransen E, Vanden Berghe W, Sangiorgi L, Wuyts W. 2012. Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region. *Gene* 492:148–159.
- Krenn EC, Wille I, Gesslbauer B, Poteser M, van Kuppevelt TH, Kungl AJ. 2008. Glycanogenomics: A qPCR-approach to investigate biological glycan function. *Biochem Biophys Res Commun* 375:297–302.
- Liu J, Shriver Z, Blaiklock P, Yoshida K, Sasisekharan R, Rosenberg RD. 1999a. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues. *J Biol Chem* 274:38155–38162.
- Liu J, Shworak NW, Sinaÿ P, Schwartz JJ, Zhang L, Fritze LM, Rosenberg RD. 1999b. Expression of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase isoforms reveals novel substrate specificities. *J Biol Chem* 274:5185–5192.
- Lu YC, Kim I, Lye E, Shen F, Suzuki N, Suzuki S, Gerondakis S, Akira S, Gaffen SL, Yeh WC, Ohashi PS. 2009. Differential role for c-Rel and C/EBP β / δ in TLR-mediated induction of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 182:7212–7221.
- Martinez P, Denys A, Delos M, Sikora AS, Carpentier M, Julien S, Pestel J, Allain F. 2015. Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* 25:502–513.
- MaruYama T. 2015. The nuclear I κ B family of proteins controls gene regulation and immune homeostasis. *Int Immunopharmacol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.053>.
- Medzhitov R, Horng T. 2009. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 9:692–703.
- Meirovitz A, Goldberg R, Binder A, Rubinstein AM, Hermano E, Elkin M. 2013. Heparanase in inflammation and inflammation-associated cancer. *FEBS J* 280:2307–2319.
- Mortier A, Van Damme J, Proost P. 2012. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett* 145:2–9.
- Müller B, Prante C, Kleesiek K, Götting C. 2009. Identification and characterization of the human xylosyltransferase I gene promoter region. *J Biol Chem* 284:30775–30782.
- Müller B, Prante C, Knabbe C, Kleesiek K, Götting C. 2013. First identification and functional analysis of the human xylosyltransferase II promoter. *Glycoconj J* 30:237–245.
- Nasser NJ. 2008. Heparanase involvement in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci* 65:1706–1715.
- Neininger A, Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Winzen R, Eckert R, Volk HD, Holtmann H, Kollias G, Gaestel M. 2002. MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J Biol Chem* 277:3065–3068.
- Newton R, Stevens DA, Hart LA, Lindsay M, Adcock IM, Barnes PJ. 1997. Superinduction of COX-2 mRNA by cycloheximide and interleukin-1 β involves increased transcription and correlates with increased NF- κ B and JNK activation. *FEBS Lett* 418:135–138.
- O'Mahony DS, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC. 2008. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci* 5:1–8.
- Palanisamy V, Jakymiw A, Van Tubergen EA, D'Silva NJ, Kirkwood KL. 2012. Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs. *J Dent Res* 91:651–658.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. 1995. MatInd and matInspector: New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23:4878–4884.
- Roger T, Out TA, Jansen HM, Lutter R. 1998. Superinduction of interleukin-6 mRNA in lung epithelial H292 cells depends on transiently increased C/EBP activity and durable increased mRNA stability. *Biochim Biophys Acta* 1398:275–284.
- Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. 2011. Heparan sulfate proteoglycans. *CSH Perspect Biol* 3:a004952.
- Stoecklin G, Stoeckle P, Lu M, Muehleemann O, Moroni C. 2001. Cellular mutants define a common mRNA degradation pathway targeting cytokine AU-rich elements. *RNA* 7:1578–1588.
- Szatmary Z. 2012. Molecular biology of toll-like receptors. *Gen Physiol Biophys* 31:357–366.
- Thacker BE, Xu D, Lawrence R, Esko JD. 2014. Heparan sulfate 3-O-sulfation: A rare modification in search of a function. *Matrix Biol* 35:60–72.
- Vanpouille C, Deligny A, Delehedde M, Denys A, Melchior A, Liénard X, Lyon M, Mazurier J, Fernig DG, 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.
- Wang L, Fuster M, Sriramarao P, Esko JD. 2005. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol* 6:902–910.
- Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW, Parks TP. 1992. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor- α and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 267:12030–12035.
- Xia G, Chen J, Tiwari V, Ju W, Li JP, Malmstrom A, Shukla D, Liu J. 2002. Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an anti-thrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1. *J Biol Chem* 277:37912–37919.
- Xing Z, Jordana M, Braciak T, Ohtoshi T, Gaudie J. 1993. Lipopolysaccharide induces expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, interleukin-8, and interleukin-6 in human nasal, but not lung, fibroblasts: Evidence for heterogeneity within the respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:255–263.

- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324–329.
- Yoshie O, Tada K, Ishida N. 1986. Binding and crosslinking of ¹²⁵I-labeled recombinant human tumor necrosis factor to cell surface receptors. *J Biochem* 100:531–541.
- Zhang L, Lawrence R, Schwartz JJ, Bai X, Wei G, Esko JD, Rosenberg RD. 2001. 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. 2010. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci* 93:1–17.
- Zhao W, Liu M, D'Silva NJ, Kirkwood KL. 2011. Tristetraprolin regulates interleukin-6 expression through p38 MAPK-dependent affinity changes with mRNA 3' untranslated region. *J Interferon Cytokine Res* 31:629–637.
- Zhou HR, Islam Z, Pestka JJ. 2003. Kinetics of lipopolysaccharide-induced transcription factor activation/inactivation and relation to proinflammatory gene expression in the murine spleen. *Toxicol Appl Pharmacol* 187:147–161.
- Zhu J, He F, Hu S, Yu J. 2008. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 24:481–484.