

Université de Lille

Thèse de Doctorat

Présentée par

Charles HELLEC

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Implication des héparanes sulfates 3-*O*-sulfotransférases (HS3STs) dans les processus cellulaires associés au cancer

Soutenue le 14 Décembre 2018 devant la commission d'examen :

Président : Pr. Robert-Alain Toillon (Université de Lille)

Rapporteurs : Dr. Sylvie Fournel-Gigleux (Université de Lorraine)
Pr. Patricia Albanese (Université Paris-Est Créteil Val de Marne)

Examineurs : Dr. Romain Vivès (Université Joseph Fourier Grenoble I)
Pr. Fabrice Allain (Université de Lille)

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Fabrice Allain à l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR n° 8576 du CNRS, Directeur : Pr. Christophe D'Hulst ; Université de Lille).

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

Résumé en français

Les héparanes sulfates (HS) sont des polysaccharides linéaires présents à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire. Leur structure résulte de l'assemblage d'un grand nombre d'unités disaccharidiques formées d'un acide uronique lié à une glucosamine. Pendant leur biosynthèse, ils subissent une étape de maturation au cours de laquelle diverses familles de sulfotransférases peuvent agir et ajouter des groupements sulfates en différentes positions des unités disaccharidiques. Ce système de biosynthèse particulier confère aux HS une large hétérogénéité structurale et est à l'origine de leurs capacités d'interaction avec un large spectre de ligands. Par conséquent, les HS sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques normaux mais aussi pathologiques.

La dernière modification des chaînes HS consiste en l'ajout d'un groupement sulfate en position C3 des glucosamines. Elle est réalisée par les enzymes de la famille des héparanes sulfates 3-*O*-sulfotransférases (HS3STs), qui est représentée chez l'Homme par sept isoenzymes présentant des spécificités de substrat et une expression tissulaire différentes. Le rôle des HS3STs dans le développement des cellules cancéreuses est controversé. Alors que plusieurs études ont montré qu'elles étaient peu exprimées voire totalement absentes des cellules cancéreuses en culture, suggérant un rôle potentiellement anti-tumoral, d'autres travaux donnent à penser que les héparanes 3-*O*-sulfatés seraient impliqués dans la progression tumorale. Cependant, aucune étude n'a été réalisée en comparant l'expression de plusieurs HS3STs dans le même modèle cellulaire, et les mécanismes mis en jeu demeurent inconnus. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle des HS3ST2, HS3ST3A, HS3ST3B et HS3ST4 dans les mécanismes pro-tumoraux en utilisant comme modèles les cellules de cancer du sein MDA-MB-231.

Nous avons observé que la surexpression transitoire des HS3ST2, HS3ST3B et HS3ST4 conduisait à une augmentation de la prolifération cellulaire alors que celle de la HS3ST3A n'avait pas d'effet. De même, la capacité des cellules à former des colonies est largement augmentée par l'expression des HS3ST2, HS3ST3B et HS3ST4. Il s'est avéré que ces effets étaient associés à une augmentation de l'activation de Src et de Akt, des voies classiquement activées chez les cellules cancéreuses. Par ailleurs, nous avons observé une diminution des niveaux de I κ B corrélée à une augmentation de la quantité de phospho-p-65 et de l'expression de protéines anti-apoptotiques, suggérant que la surexpression des HS3ST2, HS3ST3B et HS3ST4 induisait une augmentation de l'activation de la voie NF- κ B et favorisait la survie cellulaire. De manière cohérente, nous avons observé que les cellules surexprimant ces trois enzymes étaient plus résistantes à l'apoptose induite par des stimuli pro-apoptotiques ou par des cellules NK. Ces résultats suggèrent donc que les héparanes 3-*O*-sulfatés, en plus de favoriser leur prolifération et d'augmenter leur viabilité, protègent les cellules cancéreuses vis-à-vis du système immunitaire. Afin d'approfondir la compréhension des mécanismes moléculaire sous-jacents, nous avons ensuite focalisé notre étude sur la neuropiline-1. Il s'agit d'une protéine membranaire initialement identifiée dans les neurones. Elle est aussi exprimée chez les cellules cancéreuses, où elle est connue pour agir en tant que co-récepteur pour divers facteurs de croissance. En outre, il a récemment été décrit qu'elle était un ligand des héparanes 3-*O*-sulfatés. Nos résultats montrent que l'inactivation de la neuropiline-1 a des effets importants sur les réponses des cellules surexprimant stablement HS3ST3B, diminuant la prolifération, la capacité à former des colonies mais aussi l'activation des voies de signalisation induites par la HS3ST3B. Ainsi, les effets induits par les héparanes 3-*O*-sulfatés pourraient être dus à une interaction avec la neuropiline-1.

Dans leur ensemble, nos résultats sont donc en faveur d'un rôle pro-tumoral des HS3STs et suggèrent que la surexpression de ces enzymes dans les cellules cancéreuses pourrait être de mauvais pronostic.

Résumé (en anglais)

Heparan sulfate (HS) is linear polysaccharide found at the cell surface and in the extracellular matrix. Its structure results from the assembly of numerous disaccharide units composed by an uronic acid linked to a glucosamine. During its biosynthesis, HS is largely modified by the action of different families of sulfotransferases, which add sulfate groups at various positions on the disaccharide units. This specific biosynthesis machinery gives rise to an important structural diversity in the structure of HS chains, which allows them to interact with a variety of protein ligands. Consequently, HS are involved in several normal physiological but also pathological processes.

The last modification in HS is 3-*O*-sulfation of the glucosamine residues. It is catalyzed by the heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferases (HS3STs) family, which is represented in human by seven isozymes that exhibit different substrate specificity and expression pattern. HS3STs function in cancer progression is controversial. Several studies have shown that the expression levels of these enzymes in cancer cells were either very low or non-detectable, thus suggesting an anti-tumoral role. Conversely, other works support the idea that 3-*O*-sulfated HS could promote tumor progression. Nevertheless, the functional impact of the expression of distinct HS3STs has never been compared in the same cellular model, and the underlying mechanisms remain unknown. Hence, we decided to focus our investigations on the pro-tumoral effects of HS3ST2, HS3ST3A, HS3ST3B and HS3ST4 by using MDA-MB-231 breast cancer cells.

We found that the transient overexpression of the isozymes HS3ST2, HS3ST3B and HS3ST4, enhanced the proliferation of MDA-MB-231 cells, whereas HS3ST3A did not show any effect. Moreover, the colony forming capacity of the cancer cells was markedly increased by the expression of HS3ST2, HS3ST3B and HS3ST4. It turns out that these effects are clearly related to an increase in the activation of Src and Akt. Complementary to this, we observed a decrease in the level of I κ B, which was correlated to an increase in the level of phospho-p65 and in the expression of anti-apoptotic proteins. These results suggested that transient overexpression of HS3ST2, HS3ST3B and HS3ST4 induced the activation of the NF- κ B pathway and favored cell survival. In line with these findings, we showed that HS3ST-transfected cells were more resistant to cell death induction by pro-apoptotic stimuli or NK cells. These results suggest that, in addition to increasing cell viability and proliferation of cancer cells, 3-*O*-sulfated HS might also exhibit a protective activity against immune system. In an attempt to further explore the underlying molecular mechanisms, we focused our investigations on neuropilin-1, which is a membrane protein initially identified in neurons. It is now well-known that neuropilin-1 is also expressed in cancer cells, in which it functions as a co-receptor for several growth factors. In addition, neuropilin-1 was recently reported to specifically interact with 3-*O*-sulfated HS. We showed that silencing neuropilin-1 had dramatic effects on the behavior of MDA-MB-231 cells that had been stably transfected with the gene encoding HS3ST3B, reducing cell proliferation and survival. Moreover, the neuropilin-1 knockdown was associated with a strong decrease in Src and Akt activation. These last results suggested that the functional impact HS3ST3B expression might be related to the interaction of 3-*O*-sulfated HS with neuropilin-1.

Taken together, our results support a model in which HS3STs display pro-tumoral functions, suggesting that an increase in their expression in cancer cells could be associated with a bad prognosis.

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier les membres du jury :

Monsieur le Professeur Robert-Alain TOILLON

Les différentes discussions que nous avons pu avoir lors de mes comités de suivi de thèse m'ont beaucoup éclairé et m'ont permis de mieux orienter mes recherches. Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de prendre la présidence de mon jury de thèse. Je tiens donc à vous exprimer mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Sylvie FOURNEL-GIGLEUX

J'aimerais, dans un premier temps, vous remercier d'avoir fait les déplacements pour participer à mes différents comités de suivi de thèse. Ces réunions ont été fructueuses grâce à l'intérêt que vous avez porté à mes travaux. C'est très logiquement que je vous ai demandé de faire partie de mon jury de thèse. Je voudrais donc aussi vous exprimer ma gratitude d'avoir accepté de rapporter mon travail.

Madame le Professeur Patricia ALBANESE

Je voudrais vous remercier sincèrement d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse en qualité de rapporteur.

Monsieur le Docteur Romain VIVES

C'est un réel plaisir de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse en qualité d'examineur. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Fabrice ALLAIN

Voilà maintenant un peu plus de quatre ans que j'ai rejoint ton équipe en M2, sans compter les stages de licence et de master. Pendant toutes ces années, tu as toujours été là pour m'aider. Je me souviens des périodes compliquées à la fin du M2 mais aussi de moments plus joyeux pendant la thèse, ou de nos discussions dans le bureau. Dès que j'avais un nouveau résultat, je venais te voir. Tu étais toujours disponible, je n'avais qu'à venir si j'avais besoin. Bien souvent, ce qui n'était que l'annonce factuelle du dernier western blot obtenu en date se transformait en réunion improvisée et les idées fusaient. Tu m'as permis de beaucoup me déplacer en congrès. C'est grâce à mes années de thèse que j'ai eu envie de poursuivre en recherche. Si je suis curieux d'aller apprendre ailleurs, tu peux être sûr que je partirai le cœur gros. Pour tout ce que tu as fait pour moi pendant ces années, je voulais donc te remercier très sincèrement.

Je voudrais également remercier :

Agnès

C'est toi qui m'as formé, comme plusieurs autres étudiants passés au 122. Et j'imagine qu'il t'a fallu être très patiente, parce que j'ai tout de même fait un certain nombre de boulettes. Mais tu m'as très rapidement fait confiance. Tu m'as énormément appris, aussi bien sur le plan technique que dans la démarche de recherche. Tu m'as accordé beaucoup de ton temps, et tu as toujours été là pour m'aider à surmonter la frustration des résultats décevants, la conception des manips ou bien les contraintes administratives qui m'ont souvent posé beaucoup de problèmes. Surtout, tu m'as transmis la passion. Tu m'as également enseigné des expressions ch'ti malgré toi, ce qui a donné lieu à quelques dialogues de sourds assez cocasses ! Toute blague mise à part, je suis extrêmement reconnaissant pour tout ce que tu as pu faire pour moi alors j'aimerais t'exprimer mes plus sincères remerciements.

Mathieu

Il est évident que sans toi, mes années au labo auraient été bien différentes. Tu as toujours été là pour apporter le sourire, la bonne humeur, ou bien la toute dernière info croustillante. Et puis les blagues, c'était un coup toi, et un coup moi, pour faire sourire au cours d'une longue journée. Mais aussi et surtout, je veux te remercier pour ta disponibilité

sans égale. On sait qu'on peut toujours compter sur toi, tu es toujours là pour donner un coup de main avec le sourire et la pêche. Comme lorsque tu t'es démené pour m'aider quand j'ai dû faire une analyse disaccharidique alors que tu étais très occupé. Tu peux être assuré de ma reconnaissance la plus sincère.

Kenji

Nous avons eu la chance de pouvoir t'accueillir dans l'équipe récemment et j'en suis très heureux. Nos discussions m'ont beaucoup ouvert l'esprit. Tu m'as sans cesse dit de ne jamais hésiter si j'avais besoin de ton aide. Tu m'as tendu la main alors je l'ai saisie. Tu m'as énormément aidé dans ma recherche de post-doc. Si jamais j'ai une réponse positive et que je pars au Japon l'année prochaine, c'est en grande partie grâce à toi. C'est toi qui m'as soufflé l'idée, c'est toi qui m'as expliqué la manière dont je devais m'y prendre. Je ne suis pas près d'oublier tout ce que tu as fait pour moi et j'en suis extrêmement reconnaissant.

Maxime

Maximinus, ou plutôt Max, tu as été là pendant mon M2 et quasiment toute ma thèse. Tu m'as transmis le flambeau de l'étude des HS3STs. Je voulais te remercier pour ton aide quotidienne au labo, qu'il s'agisse de passer des cellules ou d'arrêter une migration, Maximinus il répondait toujours présent. Il nous arrivait parfois de rester assez tard juste parce qu'on discutait de tes résultats ou des miens, et la suite on la connaît. Des discussions rarement productives mais toujours passionnantes, qui ont donné lieu à des théories plus fumeuses les unes que les autres. Qu'est-ce que c'était bon finalement ! Autant de moments qui rendaient le quotidien bien agréable. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite, tu sembles bien lancé.

Pierre et Anne-Sophie

Les deux anciens loulous du 122, je ne vous oublie pas. Pierre, c'est à tes côtés que j'ai fait mon premier stage au labo. C'est toi qui m'as transmis ta bonne humeur et ta motivation pour me donner envie de faire de la recherche. En revanche, ce n'est pas toi qui m'as appris les bonnes pratiques de laboratoires :P Heureusement qu'Anne-Soso était là pour mettre un peu d'ordre là-dedans ! C'était la fine équipe, on rigolait bien. Merci pour tous ces moments.

Mariama

Nous avons passé quelques moments sympas dans le bureau ! Je tenais à te remercier pour ces moments passés à bosser ensemble dans le monde brumeux des HS3STs. Je croise les doigts pour toi pour la suite.

L'équipe du Dr. Patricia Nagnan-Le Meillour

Patricia, Christelle, et toute l'équipe, je voulais vous remercier pour votre gentillesse et votre serviabilité. Dès qu'on a besoin d'un coup de main vous étiez là. C'était un plaisir de travailler en vous ayant comme voisins.

L'équipe du Pr. Tony Lefèbvre

Tony et ton équipe, vous avez toujours été là si besoin et c'est une grande chance d'avoir pu compter sur vous. J'ai souvent été amené à venir au 113 ou bien dans l'autre petit labo, et j'y ai toujours été accueilli avec le sourire. J'en profite pour remercier Marlène et son investissement pour la salle de culture cellulaire.

Yann et Nao

Yann, tu m'as bien aidé pour ma recherche de postdoc. Quelle que soit la réponse à ma candidature, tu peux être assuré de ma gratitude la plus sincère.

Nao, tu m'as également beaucoup aidé pour mon postdoc. Tu as fait énormément et j'en suis très reconnaissant. Mais tu m'as aussi bien aidé lorsque je préparais mon voyage au Japon, tu as pris de ton temps pour m'aiguiller sur l'itinéraire qui pouvait être le meilleur. Tu m'avais même offert un livre guide sur le Japon. Alors je veux te remercier du fond du cœur pour tout ce que tu as fait pour moi.

Maxence

Au début du M2, on m'a dit « En bas il y a un M2 qui s'appelle Maxence », ce à quoi j'ai répondu « Mais qui est Maxence ? ». Et puis finalement, une belle amitié est née. On était de la même promo, on s'est serré les coudes dans des moments difficiles au labo mais aussi pour faire face aux démarches administratives et respecter les dates limites. C'était une sacrée épreuve et il fallait bien que l'on soit deux pour ça ! Tu m'as suivi à l'entraînement, tu es le seul qui s'est vraiment accroché et ça n'a pas de prix. Tu as fait preuve d'un sacré mental, je te l'ai toujours dit et je le pense sincèrement. J'ai même réussi à te faire monter sur un ring en compétition alors que, de ton aveu personnel, c'était peu probable. C'était génial de pouvoir aller à l'entraînement ensemble le lundi soir en se mettant du bon gros son bien motivant. Merci mon vieux pour tous ces bons moments passés à philosopher. Heureusement que tu as été là pendant ces années.

Les étudiants et ex-étudiants de l'UGSF

Sven, Steffi, Clément, lorsque vous êtes partis, le C9 a perdu de sa superbe. Sven qui débarque dans mon bureau et c'est parti pour une heure de philosophie, le rire de Steffi à faire trembler les fenêtres, Clément qui était toujours là pour me rappeler que j'étais le parisien de la bande. Vous m'avez beaucoup manqué pendant cette dernière année. Quelques mails de Sven perdu avec ses GAGs de temps en temps, un message de Steffi et Clément pour se retrouver en ville. On ne s'est pas perdu et c'est bien le principal. Je vous souhaite tout le meilleur pour la suite. Je pense également à Ninon, Maité, Moyira, Alex, Paul, James, PA, Marine, Elodie, Anne-Sophie, Sumeyye, et Justine. Et bien sûr, tous ceux que je n'ai pas cités. Vous avez tous contribué au plaisir que j'ai eu à venir travailler chaque jour. Nous étions une belle équipe, merci à tous pour cette aventure géniale.

J'ai également une pensée pour les quatre étudiants que j'ai eu l'opportunité d'encadrer durant des stages de divers niveaux. Magamba, Martin, Justine et Sarah, j'ai beaucoup appris à vos côtés. Vous avez été de supers stagiaires. Alors laissez-moi vous remercier. Mention spéciale pour Sarah, je te souhaite de tout cœur de cartonner la fin de tes études. Mais connaissant tes facilités et ta capacité de travail, je suis convaincu de ta réussite.

Tous les membres de l'UGSF

Je voudrais également remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées ou juste croisées à l'UGSF pendant ces quatre dernières années. Par l'entraide, les discussions ou bien juste par un sourire, tout le monde participe au climat si convivial qui règne dans notre unité où il fait bon venir travailler.

D'une manière plus personnelle, je veux également remercier :

Le SLEC et l'ensemble de ses membres

Il y a un peu plus de sept ans, j'arrivais tout juste à Lille. Je rêvais de faire de la boxe alors j'ai cherché un club sur internet. Et c'est comme ça que je suis tombé sur l'adresse de la salle Debeyre. Tout intimidé, j'ai poussé la porte pour finalement ne plus jamais partir. Si l'on m'avait dit qu'une telle aventure sportive mais aussi et surtout humaine m'attendait, je pense que je ne l'aurais jamais cru. Je suis venu sans prétention, juste pour toucher à mon rêve de gosse. Et puis la magie du SLEC a opéré. Dans l'ambiance si chaleureuse qui caractérise notre club, vous m'avez encouragé, encore et toujours. C'est ça, l'essence du SLEC. Personne n'est mis de côté. Bientôt, les premiers grades, les premiers assauts, le GAT, les victoires et l'ambition, les défaites et la frustration qui les accompagnent parfois, la préparation au combat, ... Mais ce qui est bien plus important que toutes ces anecdotes, c'est tout ce que j'ai pu apprendre au SLEC. L'abnégation, la combativité, la volonté, le courage, l'entraide, autant de valeurs que vous m'avez transmises. Ces quelques lignes ne suffiront jamais à exprimer ma reconnaissance, ni mon admiration devant votre investissement quotidien pour le club. Alors Charlie, Jean-Marc, Guénoles, Colombe, Denis, Rémy, Sandro, et bien sûr l'ensemble des membres du club parce que je ne peux pas nommer tout le monde, laissez-moi vous dire :

merci infiniment. Vous allez me manquer. Je ne lâcherai pas la boxe française, soyez-en assurés.

Moussa et le PBFST

Moussa, où Mouss' comme j'ai pris l'habitude de t'appeler, quelle chance j'ai eu de te rencontrer. Pendant mes premiers championnats universitaires, j'apprends qu'il y a une AS boxe française à Lille 1 et que c'est toi le coach. On s'est bien entendu et voilà comment c'est parti. D'un soutien infailible, tu as toujours été là pour m'encourager et me donner confiance. J'ai mis du temps à accepter ton invitation pour venir m'entraîner à Tourcoing, et puis finalement je suis devenu le plus tourquennois des membres du SLEC. Essayer les séances de pattes d'ours magiques, c'est les adopter et ce n'est pas toi qui vas me contredire là-dessus. Mouss', c'est un des meilleurs boxeurs qu'il m'ait été donné de rencontrer, doublé d'un excellent entraîneur. Mais aussi et surtout, une personnalité en or, quelqu'un qui donne tout pour les autres. Je pense que c'est ça que l'on devrait appeler le talent. J'admire beaucoup ton implication quotidienne, ta volonté de fer, ta motivation inébranlable et j'essaye de m'en inspirer. Je te souhaite d'aller le plus haut possible en boxe française, je sais que tu y arriveras. Merci pour tout frère.

J'en profite pour remercier Bruno pour les nombreux conseils qu'il m'a donnés. Merci également au PBFST pour son accueil toujours chaleureux, venir m'entraîner chez vous a toujours été un réel plaisir.

Monsieur Maxime Dassonville, directeur adjoint du SUAPS

C'est à la fac que nous nous sommes rencontrés. D'abord en cours de de handball puisque j'avais choisi cette option, mais tu ne dois pas t'en souvenir. Je n'avais pas un niveau flamboyant, il faut bien le dire. Et puis ensuite et surtout, grâce à la boxe française. C'est en qualité de responsable de la boxe française à l'Université de Lille 1 que tu m'as accompagné et soutenu au cours des différents championnats universitaires. Tu as su me faire profiter de ton expérience d'ancien sportif professionnel et me transmettre ton calme. Tu m'as aussi accordé beaucoup de temps au cours de toutes les séances de préparation mentale. Je t'ai fait pas mal bosser, j'en suis conscient ! C'est peut-être là que nous nous sommes vraiment rencontrés en fin de compte. Grâce à toi, j'ai pu énormément évoluer dans ma pratique. Je l'aborde désormais avec beaucoup plus de recul et de sérénité, en me fixant, cette fois, les bons objectifs. Je n'oublie pas non plus les séances cardio/renforcement/boxe qu'on a pu se faire et que j'appréciais beaucoup. Je suis très reconnaissant envers toi pour tout ce que tu as pu m'apporter. Merci, merci Maxime.

Les Z'abeilles du LORC

Quelle drôle d'équipe ! J'ai beaucoup aimé venir vous voir jouer, j'ai surtout adoré vous voir progresser. Je me rappellerai très longtemps ces matchs que jouiez par 3°C, quand j'étais le seul supporter dans les gradins, emmitoufflé sous trois pulls et deux manteaux. S'il m'a fallu de la volonté, vous avez souvent dû faire preuve de beaucoup de mental pour jouer dans ces conditions. Quoique, vous jouez pour les copines. Parce que, comme vous aimez à le répéter, « Rien n'est plus bow que l'espwit d'équipe ». Chapeau bas à Simon pour le boulot qu'il accompli en tant qu'entraîneur.

Les potes de l'ISA

Rach', Paul, FX, CM, Fostier, Marine, c'est essentiellement à vous que je pense. On a partagé quelques repas et quelques bières pour se détendre lors de froides soirées d'hiver ou au cours de longues soirées printanières, et j'espère qu'on en partagera bien d'autres !

Nat' et Ali

Quelle belle rencontre, grâce aux Z'abeilles. Vous avez fini par apprivoiser l'animal sauvage qui est en moi, et ce n'est pas rien :P Nat', quelle empathie, quelle bienveillance, c'est incroyable et ça me laisse toujours admiratif. Ali, cette rage de vaincre, c'est beau à voir, on dirait une boxeuse. Et puis, ce coup de pied ! Deux personnages, mais surtout deux cœurs

faits d'or. Merci de prendre soin de nous comme vous le faites. On va partir sûrement un peu loin, mais vous viendrez nous voir. Et on se retrouvera quand on reviendra !

Juliette

Juju, Juj', Juchon, les surnoms foisonnent pour la reine des légumes ! Tu as du supporter le drôle d'engin que je suis pendant un peu plus d'un an et malgré ça tu es toujours là, c'est presque du courage. Merci pour tous ces moments souvent random et parfois presque organisés. Pluie de bons souvenirs avec toi. Tu as été importante pendant ces années mon Juchon.

Garnius et Barbius

Lille sans vous, ce n'était plus tout à fait Lille. Qu'est-ce que vous m'avez manqué ! J'ai mis plusieurs années à trouver mes amis à Lille. Sauf qu'une fois que je les ai trouvés... Ils sont partis. Bonjour l'ambiance. Blague à part, je sais bien pourquoi vous êtes partis. Vous avez chacun trouvé votre équilibre après des moments parfois très difficiles et je ne pourrais pas en être plus heureux. Aujourd'hui vous allez mieux que jamais, c'est tout ce que je vous souhaitais. Je suis vraiment content pour vous. Malgré la distance, rien ne part et c'est bien ça le principal. Et promis, un jour je reviendrai vous apprendre le game sur HOTS.

Les amis parisiens

Quelle bouffée d'oxygène à chaque fois que je suis venu vous voir. Je rechargeais les batteries pour être de nouveau prêt à affronter le quotidien. Sur le chemin de Paris, j'avais toujours la banane. Retrouver ses racines, c'est inestimable. Malgré toutes ces années passées loin de vous, vous êtes toujours là.

Dim, Pascal et Stik, nos week-ends geek ou nos soirées chills sont autant de moments qui valent tout l'or du monde. Vous arrivez tout juste à Lille et, en un clin d'œil, vous devez déjà repartir. Mais grâce aux multiples vans et autres blagues que l'on peut se faire sur messenger ou aux quelques nuits passées sur skype, vous n'avez jamais été si loin que ça.

Guigui, Roms et Dim (encore), j'ai souvent squatté chez vous. Votre appart', c'était un peu mon pied à terre à Paris. Quand je disais que j'avais un logement à Paris, je pensais à votre appart'. On y a passé des soirées mémorables, chill, entre nous, avec plus de monde. Des repas, des apéros, on y a refait le monde. Et puis vous avez finalement réussi à m'enseigner les rudiments techniques des fléchettes. Il y a encore beaucoup de progrès à faire, certes, mais rien que ça, ça n'était pas gagné.

Dona, Camille, Nono, Tarek, Mallo, Marie, Caro, Julio, Zoé, Alicette, Geo, Gangsta Man, des dîners de Noël aux soirées improvisées, des week-ends aux Glandées aux-weeks end lillois, merci pour tous ces moments de rire qui m'ont fait déconnecter de nombreuses fois. Et Raf ! Je ne suis pas très fort en téléphone mais je n'oublie pas mon Rafoufoune.

Pfif, je te mets où toi ? New-yorkaise, Australienne, Nonnais-Bretechoise, ou Parisienne ? Oui, c'est en faisant une recherche pour écrire un mot sur toi que j'ai appris comment étaient nommés les habitants de Saint-Nom la Bretèche. Mais finalement, je ne me suis pas posé la question très longtemps. Parisienne, sans aucun doute ! Quelle personnalité détonnante que cette petite dame dont j'essaye de m'inspirer, aussi intrigante que rayonnante, et qui prend en photo les parisiens de manière artistiquement impromptue mieux que personne. La seule qui m'appelle encore le Petit Prince. Et ça me fait toujours sourire, je crois que j'aime bien en fait. Merci d'avoir été là, merci pour ton soutien, ta bienveillance, ton enthousiasme et ce français dont tu as le secret. Tu reviens bientôt mais c'est moi qui vais partir. Qu'à cela ne tienne, on se retrouvera après !

Et bien sûr, le IND crew, ceux qui sont là depuis le collège où le lycée, depuis presque toujours. On se voit moins, on est moins proche, mais on garde le contact et j'en suis très heureux. Revax, Pitou, Xav, Titi, Nico, ma zouze, Staninou, Clem, une sacrée bande d'anciens.

Ma belle famille

Sylvie et Christian, comment ne pas vous remercier ? Pour toutes ces fois où je suis venu à la ferme, pour tous ces repas, ces Toumélés, ces week-ends. Vous m'accueillez toujours avec le même sourire pour toujours passer de très bons moments. Merci beaucoup.

Loulou, on ne s'est pas beaucoup vu, mais je t'apprécie vraiment et ça a toujours été un plaisir de te recevoir à la maison. Tu es sûr de bons rails et tu vas rayonner dans tes études.

J'en profite pour glisser un mot pour Anne et les cousins ! C'est comme ça que je vous appelle quand je parle de vous. Pablo, Miguel et Mathilde, c'est toujours un plaisir de vous voir. Et la petite Elsa, qui n'est d'ailleurs plus si petite que ça, je te souhaite toute la réussite possible dans tes études.

Ma famille

Papa et maman, si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. C'est vous qui avez tout rendu possible. Vous m'avez laissé venir à Lille pour entreprendre des études de biologie. Vous m'avez toujours laissé faire ce dont j'avais envie. Parfois, j'ai l'impression qu'une bonne étoile me guide vers la lumière et me porte chance. Mais qu'est-ce que c'est en réalité, une bonne étoile ? Je ne sais pas si, tout là-haut, il y a vraiment quelque chose qui m'aide à avancer. Mais ce dont je suis absolument certain, c'est que sans vous, je ne serais pas allé bien loin. Alors voilà, ma bonne étoile elle est ici et c'est vous, tout simplement. C'est vous qui m'aidez à faire mes choix, c'est vous qui me soutenez toujours, encore, et toujours. C'est grâce à vous tout ça. Aucun mot ne sera jamais suffisant pour vous exprimer à quel point je vous suis reconnaissant. Je n'aurais rien pu faire sans des parents tels que vous. J'ai des parents extraordinaires. Merci d'être comme vous êtes avec moi.

Mon frère, mon frangin, tu es toujours là, un soutien sans faille. Je te souhaite tout le meilleur que je puisse te souhaiter, tu vas trouver ta voie et ton équilibre. Et je serai là pour t'aider.

Ma grand-mère, ma petite mamie. On ne se voit pas beaucoup mamie mais tu sais, je pense beaucoup à toi. Ta porte est toujours ouverte pour nous. Merci d'être toujours là pour tes petits-fils.

Claire

Parfois, je me demande si ce n'est pas à toi que devrait revenir le plus grand mérite de cette thèse. Certes, c'est moi qui l'ai rédigée et c'est moi qui soutiens. Mais toi, tu as fait tellement plus au quotidien depuis toutes ces années. C'est toi qui étais là dans l'ombre pour que je garde le cap. C'est toi qui as tout supporté dans des moments parfois un peu sombres, emplis de doutes, de fatigue et de stress. Perdu entre le labo et ma boxe, c'est grâce à toi que j'ai pu les surmonter. C'est dur de s'impliquer partout, c'est dur mais franchement, qu'est-ce que ça vaut le coup. Et si j'ai pu me donner à 200% dans ma thèse et dans mon sport, c'est grâce à toi. Tu as parfois beaucoup pris sur toi pour me laisser faire mes choix. Plus qu'un soutien, tu m'as permis d'avancer et tu m'aides à me construire. Tu as été la clé de voute de ma vie pendant ces années. Alors voilà, pour tout ça, cette thèse, c'est aussi la tienne.

Bien sûr, il y a aussi tous ces innombrables instants de bonheur où l'on s'envole. Le temps file et les heures deviennent des secondes. Notre quotidien, ce n'est jamais vraiment du quotidien. Chaque week-end devient une escapade. Il y a toujours ce je ne sais quoi qui fait rayonner la banalité. En fait si, ce je ne sais quoi, c'est nous, tout simplement. Alors continuons à transformer chaque moment ordinaire en instant extraordinaire...

Table des matières

Avant-propos.....	1
Liste des abréviations.....	3
Généralités.....	4
Partie 1 : Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes.....	4
I. Les sous-familles de glycosaminoglycanes	4
A. <i>L'acide hyaluronique</i>	<i>4</i>
B. <i>Les chondroïtanes/dermatanes sulfates.....</i>	<i>5</i>
C. <i>L'héparine et les héparanes sulfates</i>	<i>6</i>
D. <i>Les kératanes sulfates</i>	<i>8</i>
II. Les protéoglycanes à chaînes héparanes sulfates.....	9
A. <i>La serglycine, un HSPG intracellulaire</i>	<i>10</i>
B. <i>Les HSPGs membranaires.....</i>	<i>10</i>
1. <i>Les HSPGs transmembranaires</i>	<i>11</i>
a. <i>Les syndécans.....</i>	<i>11</i>
b. <i>Le CD44.....</i>	<i>13</i>
c. <i>Le bétaglycan</i>	<i>14</i>
2. <i>Les HSPGs fixés à la membrane par une ancre GPI</i>	<i>15</i>
C. <i>Les HSPGs péricellulaires.....</i>	<i>17</i>
1. <i>L'agrine.....</i>	<i>17</i>
2. <i>Le perlécan.....</i>	<i>18</i>
3. <i>Le collagène XVIII</i>	<i>19</i>
D. <i>Les HSPGs extracellulaires de type SPOCK.....</i>	<i>20</i>
Partie 2 : La biosynthèse des héparanes sulfates	21
I. Initiation.....	21
A. <i>Formation de l'amorce tétrasaccharidique.....</i>	<i>21</i>
B. <i>Modifications de l'amorce</i>	<i>21</i>
II. Elongation	22
A. <i>Les exostosine glycosyltransférases</i>	<i>23</i>
B. <i>Les exostosines-like glycosyltransférases</i>	<i>24</i>
III. Maturation	26
A. <i>Mécanisme général.....</i>	<i>26</i>
B. <i>La N-déacétylation/N-sulfatation</i>	<i>27</i>
1. <i>La famille des NDSTs</i>	<i>27</i>
2. <i>Régulations et variations de l'expression des NDSTs.....</i>	<i>29</i>
3. <i>Différences fonctionnelles.....</i>	<i>30</i>
C. <i>L'épimérisation des acides uroniques.....</i>	<i>31</i>
D. <i>La 2-O-sulfatation.....</i>	<i>33</i>
E. <i>La 6-O-sulfatation.....</i>	<i>34</i>
F. <i>La 3-O-sulfatation.....</i>	<i>36</i>
1. <i>La famille de HS3STs.....</i>	<i>36</i>
2. <i>Spécificités de substrat.....</i>	<i>37</i>
3. <i>HS3STs et NDSTs : similarités et différences structurales.....</i>	<i>39</i>
4. <i>Localisation subcellulaire et distribution tissulaire</i>	<i>40</i>
5. <i>Prévalence de la 3-O-sulfatation.....</i>	<i>41</i>

6. Origine évolutive des HS3STs	42
G. La 6-O-désulfatation.....	42
H. Le concept de GAGosome	44
Partie 3 : Propriétés biologiques des héparanes sulfates	46
I. Interactions HS/protéines	46
A. Les protéines se liant aux HS.....	46
B. Fondamentaux des interactions avec les HS.....	46
C. Importance des conformations des HS et des protéines.....	47
D. Autres paramètres modulant les interactions.....	50
E. Liaisons de van der Waals, hydrogènes et hydrophobes.....	51
F. Spécificité des interactions.....	52
II. Mécanismes cellulaires impliquant les HS	54
A. Régulation de la formation des complexes de signalisation.....	54
B. « Cross-talk » cellulaire	56
C. Migration cellulaire	57
D. Adhérence cellulaire.....	59
E. Implication des HS dans l'endocytose	60
F. Organisation des matrices extracellulaires	61
G. Le côté obscur des HS.....	63
Partie 4 : Implications des héparanes sulfates dans les processus cancéreux	66
I. Rôles des HS dans la progression tumorale.....	66
A. Les HS des cellules cancéreuses.....	66
1. Mécanismes de régulation.....	66
2. Modifications de l'expression des protéoglycanes et des enzymes de biosynthèse des HS.....	67
B. HS et prolifération cellulaire	70
C. HS et angiogenèse.....	72
D. HS et formation des métastases	73
II. Thérapies anticancéreuses basées sur les HS	75
A. L'héparine, un HS aux propriétés anticancéreuses	75
1. Bénéfices multiples de la fonction d'anticoagulant : effets anti-angiogéniques et fragilisation des tumeurs.....	77
2. Effets sur la prolifération et le système immunitaire	78
3. Effets anti-métastatiques	79
B. Utilisation de mimétiques des HS.....	80
1. Dérivés d'héparine.....	80
2. Autres types de mimétiques de HS.....	81
C. Utilisation d'analogues des ligands	83
1. Molécules de bas poids moléculaire	83
2. Peptides anticancéreux	84
3. Cas de l'endostatine	85

Partie 5 : La 3-O-sulfatation des héparanes sulfates, une modification encore incomprise	87
I. Fonctions physiologiques de la 3-O-sulfatation	87
A. <i>Activité anticoagulante</i>	<i>87</i>
B. <i>Fixation des facteurs de croissance</i>	<i>90</i>
C. <i>3-O-sulfatation et inflammation.....</i>	<i>90</i>
D. <i>Clairance de l'héparine circulante</i>	<i>91</i>
E. <i>Importance des HS 3-O-sulfatés dans le développement.....</i>	<i>92</i>
II. Processus pathologiques associés à la 3-O-sulfatation	94
A. <i>Rôles des HS 3-O-sulfatés dans les interactions hôte/pathogène</i>	<i>94</i>
1. <i>Infection par HSV-1</i>	<i>94</i>
2. <i>Infection par d'autres pathogènes.....</i>	<i>95</i>
B. <i>Implication de la 3-O-sulfatation dans la maladie d'Alzheimer</i>	<i>96</i>
C. <i>Les HS3STs et le cancer.....</i>	<i>96</i>
1. <i>Les HS3STs, des facteurs protecteurs antitumoraux</i>	<i>96</i>
2. <i>Les HS3STs en tant que facteurs pro-cancéreux.....</i>	<i>98</i>
3. <i>Les HS3STs, des facteurs régulateurs de la progression tumorale.....</i>	<i>100</i>
Objectifs du travail de thèse.....	102
Travaux personnels.....	104
Partie 1 : Caractérisation des effets induits par les HS3STs chez les cellules de cancer du sein MDA-MB-231	104
I. Introduction.....	104
II. Publication	105
III. Discussion.....	132
Partie 2 : Aspects moléculaires des réponses pro-tumorales induites par l'expression de HS3ST3B.....	136
I. Implication de la neuropiline-1 dans les réponses cellulaires induites par les HS3STs.....	136
A. <i>Introduction</i>	<i>136</i>
1. <i>Expression tissulaire et structure des neuropilines-1 et -2</i>	<i>136</i>
2. <i>Fonctions de la neuropiline-1</i>	<i>137</i>
a. <i>Vascularisation et croissance axonale</i>	<i>138</i>
b. <i>Régulation de la réponse immunitaire</i>	<i>139</i>
3. <i>La neuropiline-1 dans le cancer</i>	<i>139</i>
4. <i>La neuropiline-1 et les HS</i>	<i>140</i>
5. <i>Travaux de recherche.....</i>	<i>142</i>
B. <i>Publication</i>	<i>142</i>
II. Résultats complémentaires	163
III. Discussion.....	166
Conclusion générale.....	170
Bibliographie.....	177
Annexes.....	217

Avant-propos

« Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. »

Métaphysique, Aristote

C'est ainsi qu'Aristote, dans son ouvrage *Métaphysique*, a été l'un des premiers à définir la capacité de s'étonner comme une condition *sine qua non* à la pensée scientifique. Même si la description qu'il en donne semble extrêmement simple, une telle façon de penser n'est pas chose aisée. Si la science correspond à la connaissance, sommes-nous réellement si nombreux à nous étonner de ce que nous ne connaissons pas ? Et ne sommes-nous pas encore moins nombreux à nous étonner de ce que nous connaissons ? Très peu admettront en effet être surpris par la pomme qui tombe ou par le cycle lunaire. Et c'est là toute la difficulté de la démarche scientifique.

Selon Aristote, nous devrions toujours expérimenter sans attendre un dénouement en particulier. Malheureusement, l'objectivité n'existe pas et aucun jugement n'est impartial. Poser des hypothèses et tenter d'y répondre, c'est l'essence même de la recherche. Et pourtant, cela semble en contradiction avec la pensée d'Aristote. La formulation d'une hypothèse induit forcément l'attente d'un résultat. Dès lors, deux entraves peuvent survenir. D'une part, il est hautement probable que cette attente biaise la démarche : l'obtention d'un résultat qui n'est pas celui escompté peut provoquer le refus du scientifique et donc empêcher l'avancement. En effet, le scientifique ici n'est plus étonné par les choses telles qu'elles sont mais par les choses telles qu'il les perçoit. D'autre part, l'observation d'un résultat attendu peut nuire à l'étonnement. Il est déjà si difficile de s'étonner d'un fait inconnu, alors comment être surpris par une observation déjà considérée comme connue ?

Cette dualité tout à fait singulière entre grande simplicité et extrême complexité fait de la science une discipline tantôt gratifiante, tantôt frustrante, mais toujours passionnante. C'est ce paradoxe qui m'a fait aimer la science et m'a poussé, en m'interrogeant chaque jour, à prendre la voie de la recherche. Même si s'étonner s'avère être un exercice ardu, il n'est pour autant pas inaccessible. Ne suffirait-il pas de prendre de la hauteur pour voir les choses différemment ? Cela étant, je ne vois pas l'étonnement scientifique comme étant purement rationnel et dénué d'émotion. L'étonnement suscite la curiosité, provoque l'enthousiasme, et entraîne un grain de folie, moteur au quotidien. Ce petit grain de folie, c'est celui qui a largement contribué au plaisir que j'ai pu prendre pendant mes années de thèse et qui m'a permis d'avancer. Parce qu'à mon sens, cette folie fait aussi partie de la pensée scientifique et donne sa raison d'être à la recherche. Comme l'a souligné François de La Rochefoucauld dans ses *Œuvres Complètes*, est-il vraiment question de rationalisme s'il n'y a pas de folie ?

« Sans un grain de folie, il n'est point d'homme raisonnable. »

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 », sous la direction du Pr. Fabrice Allain.

Il a fait l'objet des publications et communications suivantes :

- Publications

Hellec C., Diawara M., Carpentier M., Denys A. and Allain F. (2018). The pro-tumoral activity of heparane sulfate 3-*O*-sulfotransferase 3B in breast cancer MDA-MB-231 cells is dependent on the expression of neuropilin-1. *Molecules, Special Issue "Heparan Sulfate and Heparin: Challenges and Controversies"*, 23.

Hellec C., Delos M., Carpentier M., Denys A. and Allain F. (2018). The heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferases (HS3ST) 2, 3B and 4 enhance proliferation and survival in breast cancer MDA-MB-231 cells. *PLoS ONE*, 13: e0194676.

Delos M., Foulquier F., Hellec C., Vicogne D., Fifre A., Carpentier M., Papy-Garcia D., Allain F., and Denys A. (2018). Heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase 2 (HS3ST2) displays an unexpected subcellular localization in the plasma membrane. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1862: 1644-1655.

Delos M., Hellec C., Foulquier F., Carpentier M., Allain F. and Denys A. (2016). Participation of 3-*O*-sulfated heparan sulfates in the protection of macrophages by herpes simplex virus-1 glycoprotein D and cyclophilin B against apoptosis ». *FEBS Open Bio*, 7: 133-148.

Sikora AS., 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. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 80: 57-65.

- Communications orales

Hellec C. et Delos M. "Heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferases : factors of cell survival". 2^{èmes} Journées du GDR Gagosciences, 09-10 Octobre 2017, Grenoble.

- Communications par affiches

Hellec C., Denys A., Carpentier M. and Allain F. "The heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferases (HS3ST) 2, 3B and 4 enhance breast cancer cell proliferation and survival". 27^{èmes} Journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG 2018), 21-25 Mai 2018, Nouan-le-Fuzelier.

Hellec C., Denys A., Delos M., Carpentier M. and Allain F. "Heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferases, new pro-tumoral factors involved in cancer cell survival?" 7-Lakes Proteoglycans Conference, 10th-14th September 2017, Varese, Italy.

Hellec C., Denys A., Delos M., Carpentier M. and Allain F. "Pro-tumoral activity of 3-*O*-sulfotransferase". 100 years of Heparin, 10th October 2016, Paris, 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^{èmes} Journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG 2016), 23-27 Mai 2016, Aussois.

Delos M., Foulquier F., Hellec C., Allain F. and Denys A. "Subcellular localization of heparan 3-OST2, 3A and 3B". 26^{èmes} Journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG 2016), 23-27 May 2016, Aussois.

Liste des abréviations

AH : Acide Hyaluronique

BMP : *Bone Morphogenic Protein*

AT-III : Anti-thrombine III

CS : Chondroïtane Sulfate

CyP : Cyclophiline

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DS : Dermatan Sulfate

EGF : *Epidermal Growth Factor*

ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*

EXT : *Exostosin glycosyltransferase*

EXTL : *Exostosin glycosyltransferase like*

FGF : Fibroblast Growth Factor

GAG : Glycosaminoglycane

Gal : Galactose

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GlcNAc : *N*-acétyl glucosamine

GlcUA : Acide glucuronique

GlcN : Glucosamine

HBP : *Heparin Binding Protein*

HBPM : Héparine de Bas Poids Moléculaire

HGF : *Hepatocyte Growth Factor*

HSBP : *Heparan Sulfate Binding Protein*

HPRT : *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*

HS : *Heparan Sulfate*

HS2ST : *Heparan Sulfate 2-O-Sulfotransférase*

HS3ST : *Heparan Sulfate 3-O-Sulfotransférase*

HS6ST : *Heparan Sulfate 6-O-Sulfotransférase*

HSV-1 : *Herpes Simplex Virus 1*

IdoUA : Acide Iduronique

IFN-γ : Interféron-γ

IGF : *Insulin-like Growth Factor*

IL : Interleukine

KIR : *Killer Inhibitory Receptor*

KS : Kéراتane Sulfate

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinases*

M-CSF : *Macrophage colony-stimulating factor*

MEC : Matrice Extracellulaire

NDST : *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférase

NK : *Natural Killer*

NF-κB : *Nuclear Factor of κB*

Nrp : Neuropiline

PAPS : Phospho-adénosyl phosphosulfate

PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*

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

siRNA : *small-interfering RNA*

STAT : *Signal Transducer and Activation of Transcription*

Sulf : 6-*O*-endosulfatase

TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF : *Transforming Growth Factor*

TNF : Tumor Necrosis Factor

UFH : Unfractionated Heparin

UTR : Untranslated Region

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Xyl : Xylose

Généralités

PARTIE 1 : LES GLYCOSAMINOGLYCANES ET LES PROTEOGLYCANES

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polysaccharides linéaires constitués de la répétition d'unités disaccharidiques qui sont composées d'une hexosamine liée à un acide uronique ou à un galactose (Gal). L'acide uronique peut être de l'acide D-glucuronique (GlcUA) ou L-iduronique (IdoUA), et l'hexosamine est soit la D-glucosamine (GlcN), soit la D-galactosamine (GalN). Selon la nature du disaccharide répété, les GAGs ont été classés en quatre sous-familles : l'acide hyaluronique (AH), les chondroïtanes et dermatanes sulfates (CS/DS), les héparanes sulfates (HS) et l'héparine, et les kératanes sulfates (KS). Ils présentent des profils de substitution variés : les fonctions hydroxyles peuvent être sulfatées à différentes positions et les fonctions amines peuvent être sulfatées ou acétylées. A l'exception de l'AH, les GAGs sont liés à des protéines par liaison covalente pour former des protéoglycanes.

I. Les sous-familles de glycosaminoglycanes

A. L'acide hyaluronique

L'AH est une molécule de haut poids moléculaire (10^2 à 10^4 kDa) qui a été isolée pour la première fois à partir de l'humeur vitrée de l'œil par Meyer et Palmer en 1934. Sa structure exacte n'a cependant été déterminée que 20 ans plus tard (Weissman & Meyer, 1954). Il est composé du disaccharide [acide D-glucuronique (β 1-3) *N*-acétyl-D-glucosamine (β 1-4)] qui peut être répété 3000 à 30000 fois (Figure 1) (Anderegg *et al.*, 2014). Sa structure le définit comme étant un GAG bien qu'il présente diverses particularités qui le distinguent des autres membres de cette famille. Outre le fait qu'il ne subisse aucune modification, il n'est jamais lié à un *core* protéique. De plus, ses enzymes de biosynthèse se situent au niveau de la face interne de la membrane plasmique, tandis que les autres GAGs sont polymérisés et modifiés au niveau de l'appareil de Golgi (Bart *et al.*, 2015).

L'AH est un composant majeur de la MEC (Matrice Extracellulaire), où il exerce des fonctions mécaniques et biologiques. Grâce à sa structure hélicoïdale et ses caractères fortement anioniques et polaires, l'AH joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'hydratation et de la turgescence des tissus. En effet, il peut capter l'équivalent de 1000 fois son poids en molécules d'eau. Par sa structure imposante, il est également essentiel dans la mise en place de l'architecture de la MEC (Anderegg *et al.*, 2014). En outre, l'AH est impliqué dans la régulation de la prolifération, de la migration et de l'adhérence cellulaires *via* ses interactions notamment avec le CD44 et les récepteurs de la famille RHAMM (*Receptor for HA-Mediated Motility*) (Lee & Spicer, 2000). L'AH participe aussi à la régulation de la réponse inflammatoire puisqu'il est capable de recruter et d'activer les leucocytes (Petrey *et al.*, 2014).

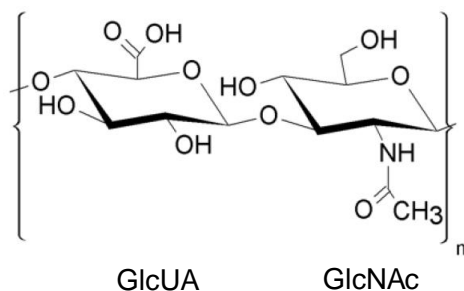


Figure 1 : Structure de l'unité disaccharidique composant l'acide hyaluronique. D'après Anderegge *et al.*, 2014.

B. Les chondroïtanes/dermatanes sulfates

A la différence de l'AH, les CS et DS ne sont pas libres. Ils sont liés à des protéines par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide dont la séquence est GlcUA-Gal-Gal-Xyl pour former les protéoglycanes à chaînes chondroïtanes ou dermatanes sulfates (CSPGs ou DSPGs). Il existe plusieurs sous-familles de CS, définies par les sulfatations que les chaînes polysaccharidiques subissent. L'unité saccharidique de base des CS est la suivante : [acide D-glucuronique (β 1-3) *N*-acétyl-D-galactosamine] (Figure 2A). Le disaccharide non sulfaté est appelé unité O : il peut être sulfaté sur les hydroxyles en position C4 et/ou C6 des résidus de GalNAc et en position C2 du résidu de GlcUA. Lorsque les chaînes sont composées de disaccharides sulfatés en position 4 (unité A) ou 6 (unité C) du résidu de GalNAc, on parle de CS de type A ou de CS de type C, respectivement. Les CS de type E, composés majoritairement de disaccharides sulfatés en positions C4 et C6 des résidus de GalNAc (unité E), et les CS de type D, sulfatés en position C2 des résidus de GlcUA et C6 des résidus de GalNAc (unité D), sont plus rares (Figure 2B).

L'épimérisation du résidu de GlcUA de l'unité O conduit à la formation d'un résidu de IdoUA. Le disaccharide qu'il forme avec un résidu de GalNAc est un composant des CS de type B, aussi appelés DS. Ainsi, on peut retrouver des résidus de IdoUA le long des chaînes DS, contrairement aux chaînes CS (Figure 2A). Ils sont obtenus par épimérisation de certains disaccharides composant les CS. Lorsque le disaccharide IdoUA-GalNAc n'est pas sulfaté, il est appelé unité iO. Il peut être sulfaté en position 4 de la GalNAc (unité iA), en position C4 et C6 de ce même résidu (unité iE), ou bien en position C2 du résidu d'IdoUA et C4 du résidu de GalNAc (Figure 2B) (Mikami & Kitagawa, 2009 ; Thelin *et al.*, 2013).

La biosynthèse des CS/DS a lieu dans l'appareil de Golgi. Il s'agit d'un système complexe et régulé faisant intervenir plus d'une quinzaine d'enzymes. Les CS/DS sont donc des molécules qui présentent une large hétérogénéité structurale en termes de longueur de chaîne et de densité en sulfates. Ces molécules sont à même d'interagir avec de nombreux ligands protéiques. Elles sont alors impliquées dans des processus biologiques divers tels que la cicatrisation, l'ostéogenèse ou le développement des neurones. Les CS et les DS sont retrouvés

essentiellement dans les tissus conjonctifs et participent à la structure et la résistance des cartilages et du derme, respectivement (Lauder, 2009 ; Malmström *et al.*, 2012).

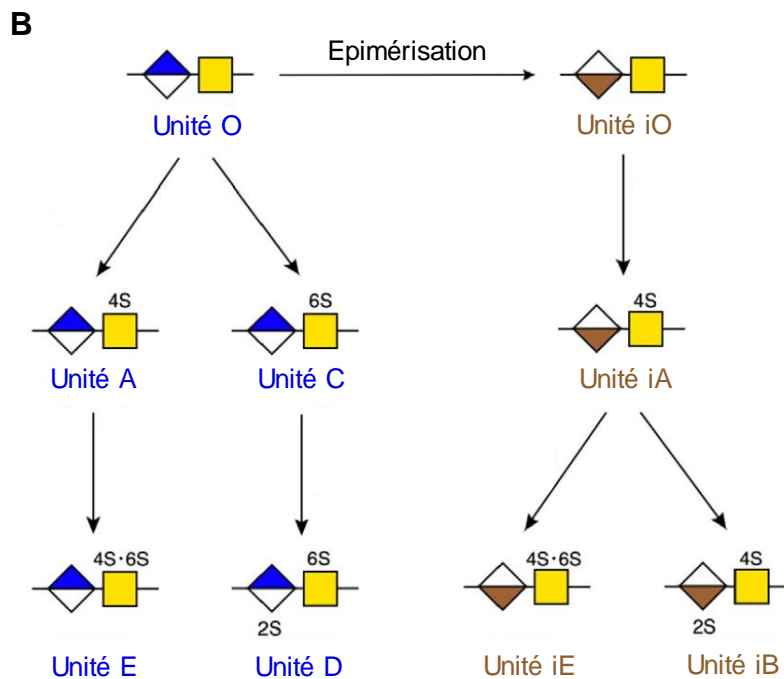
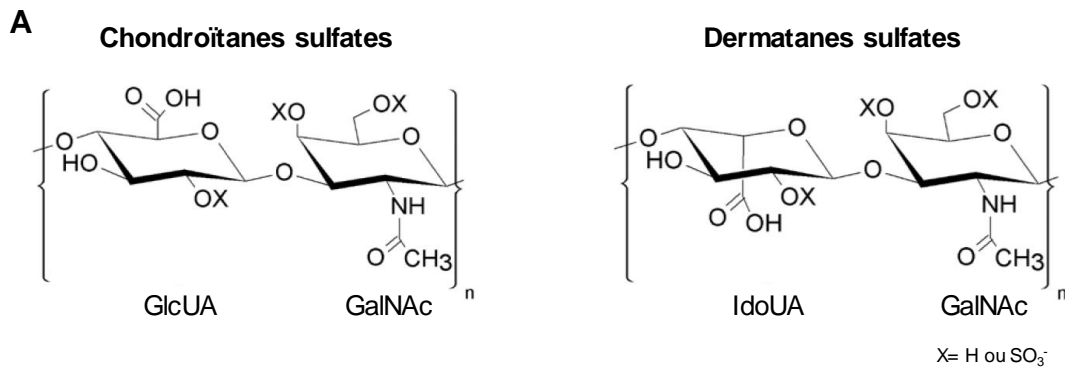


Figure 2 : Structure des unités disaccharidiques composant les CS et les DS. (A) Structure des unités disaccharidiques des CS et DS. **(B)** Maturation des CS et des DS. D'après Mikami & Kitagawa, 2013.

C. L'héparine et les héparanes sulfates

Les HS sont formés par la répétition de 50 à 250 unités disaccharidiques composées d'un acide uronique, GlcUA ou IdoUA, lié par une liaison 1-4 à une GlcN. Ce disaccharide peut subir différentes modifications. La fonction amine de la GlcN peut être sulfatée, acétylée ou bien rester non substituée. Les fonctions hydroxyles peuvent être sulfatées en position C2 des acides uroniques ainsi qu'en position C3 et/ou C6 des GlcN. Le résidu de GlcUA peut également subir l'action d'une épimérase pour devenir un IdoUA (Figure 3A). L'ensemble de ces modifications permet, en théorie, de générer 48 disaccharides différents. Cependant, en raison des contraintes dues à la machinerie de biosynthèse des HS et à l'encombrement stérique, seuls 24 disaccharides ont été identifiés chez l'Homme.

La biosynthèse des HS se déroule dans l'appareil de Golgi grâce à une machinerie enzymatique très complexe et finement régulée. Ils sont liés à une sérine du *core* protéique par l'intermédiaire du même tétrasaccharide de liaison que les CS/DS pour former les protéoglycanes à chaînes HS ou HSPGs. Les différentes sulfotransférases et l'épimérase agissent ensuite de concert dans un mécanisme où le produit d'une enzyme devient le substrat de l'enzyme suivante. C'est cette particularité qui est à l'origine de la très grande variabilité structurale des HS. En effet, en plus de l'hétérogénéité liée à la sulfatation/épimérisation des disaccharides, il existe un degré de complexité supérieur lié à l'alternance de différents domaines plus ou moins modifiés le long d'une chaîne HS. Ainsi, les domaines NS (*N*-sulfatés), aussi appelés domaines S, sont des domaines très modifiés et sulfatés. Les domaines NA (*N*-acétylés) sont faiblement sulfatés. Les domaines NA/NS sont des domaines de transition présents entre les domaines NA et les domaines NS (Figure 3B) (Esko & Lindahl, 2001 ; Esko & Selleck, 2002).

L'héparine est un HS particulier qui est fortement modifié et qui a un poids moléculaire compris entre 12 et 20 kDa. Elle possède un degré de sulfatation très important, avec une répartition relativement homogène des sulfates le long de la chaîne. Elle ne présente donc pas de domaines distincts. Elle est composée majoritairement de disaccharides comportant un résidu de IdoUA sulfaté en position C2 lié à un résidu de GlcN sulfaté sur la fonction amine et en position C6. Ces mêmes résidus peuvent également être sulfatés en position C3 mais dans une moindre mesure, bien que cette modification soit plus fréquente que dans les HS (Figure 3A). L'héparine n'est synthétisée que par les mastocytes (Lindahl *et al.*, 1998 ; Shriver *et al.*, 2012).

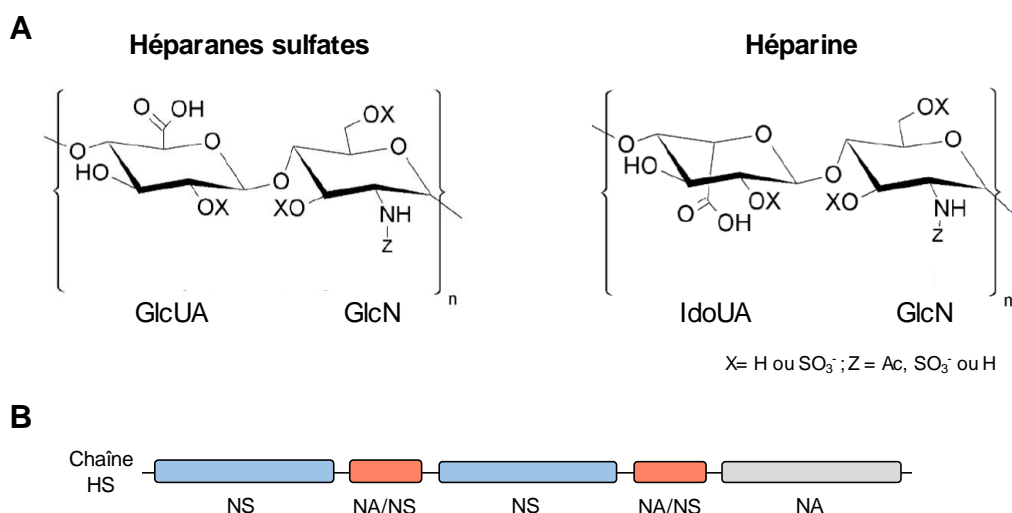


Figure 3 : Structure du disaccharide des HS et de l'héparine. (A) Structures des disaccharides composant les HS et l'héparine. **(B)** Représentation schématique de l'alternance des différents domaines le long d'une chaîne HS. D'après Esko & Selleck, 2002.

D. Les kératanes sulfates

Initialement isolés à partir d'extraits de cornée, les KS ont également été retrouvés dans les cartilages et d'autres tissus. Leur structure a été élucidée en 1953 par Meyer *et al.* Ce sont des molécules composées par un enchainement de *N*-acétyl-lactosamine dont la structure est [D-galactose (β 1-4) *N*-acétyl-D-glucosamine (β 1-3)], le disaccharide pouvant être répété au maximum 30 fois (Figure 4A). Ils sont donc dépourvus d'acides uroniques, à la différence des autres GAGs. Ils sont attachés à des protéines pour former les protéoglycanes à chaîne KS (KSPGs). Ils peuvent être séparés en trois classes en fonction du type de liaison qui les lie au *core* protéique : les KS-I, les KS-II et les KS-III (Figure 4B). Les KS-I, retrouvés dans la cornée, sont liés à une asparagine du *core* protéique par l'intermédiaire d'une liaison de type *N*-glycane et peuvent être fucosylés sur le premier résidu de GlcNAc. Les KS-II, issus des cartilages, sont liés à des résidus de sérine ou thréonine grâce à une liaison de type *O*-glycosidique. Les KS-III sont également liés au *core* protéique par l'intermédiaire d'une liaison *O*-glycosidique, mais établie cette fois entre un mannose et une sérine (Funderburgh, 2000).

La biosynthèse des KS se déroule dans l'appareil de Golgi. Ils présentent une grande diversité structurale, avec des tailles et des profils de sulfatations pouvant varier de manière très importante. De plus, ils peuvent parfois posséder des résidus d'acides sialiques au niveau de leur extrémité non réductrice (Funderburgh, 2002). Au niveau fonctionnel, les KS jouent un rôle dans le maintien et l'hydratation des tissus. Par exemple, ils permettent aux cartilages de résister aux contraintes physiques. Dans la cornée, ils sont essentiels au maintien de la transparence pour assurer la vision (Quantock *et al.*, 2010).

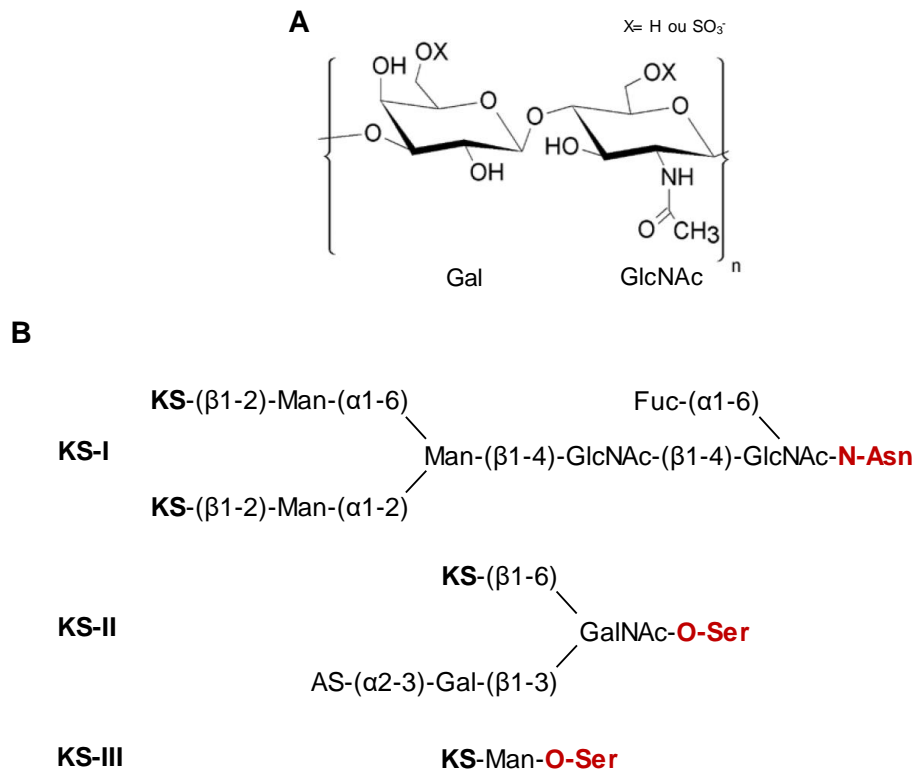


Figure 4 : Structure des kératanes sulfates. (A) Structure du disaccharide répété dans les KS. **(B)** Structure des oligosaccharides de liaison caractérisés dans les KS. La mention « KS » signifie qu'une chaîne de KS est attachée selon les liaisons indiquées. AS : Acide Sialique. D'après Pomin, 2015.

II. Les protéoglycanes à chaînes héparanes sulfates

Les HSPGs peuvent être classés selon leur localisation subcellulaire. On distingue alors les HSPGs intracellulaires, membranaires, péricellulaires et extracellulaires. Le nom des principaux HSPGs connus et leur localisation sont résumés dans le tableau 1 (Iozzo & Schaefer, 2015).

Tableau 1 : Noms et localisations des HSPGs.

D'après Iozzo & Schaefer, 2015.

Localisation	Sous localisation	Nom	Symbole du gène
Intracellulaire	Granules de sécrétion	Serglycine	<i>SRGN</i>
Surface cellulaire	Transmembranaire	Syndécan 1-4	<i>SDC</i>
		Bétaglycan	<i>TGFBR3</i>
		CD44v3	<i>CD44</i>
	Ancre GPI	Glypican 1-6	<i>GPC</i>
Péricellulaire	Lame basale	Perlécane	<i>HSPG2</i>
		Agrine	<i>AGRIN</i>
		Collagène XVIII	<i>COL18A1</i>
Extracellulaire	Type SPOCK	Testican 1-3	<i>SPOCK</i>

A. La serglycine, un HSPG intracellulaire

A ce jour, un seul protéoglycane ayant une localisation intracellulaire a été décrit, il s'agit de la serglycine. C'est d'ailleurs le premier protéoglycane dont la séquence a été clonée. La séquence primaire du *core* protéique, dont la masse est de 17 kDa, est composée de répétitions de sérine et de glycine. C'est ce qui lui a valu son appellation (Kolset & Tveit, 2008). La serglycine a été initialement découverte dans les vésicules de sécrétion des cellules hématopoïétiques. Elle peut donc être sécrétée et se retrouver parfois dans le milieu extracellulaire. Elle est tout de même considérée comme étant un protéoglycane intracellulaire puisque la sécrétion des granules n'est pas constitutive. La serglycine est également synthétisée par les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les chondrocytes, et les cellules souches endothéliales et embryonnaires (Shick, 2010 ; Meen *et al.*, 2011). Elle présente la particularité d'être un protéoglycane dont la nature des chaînes polysaccharidiques et leur taux de sulfatation dépendent du type cellulaire. Ainsi, la serglycine produite par les mastocytes est liée à de l'héparine quand celle produite dans les autres leucocytes porte des CS de type A (Schick, 2010).

La serglycine n'a pas fait l'objet de nombreuses études et ses fonctions sont encore mal connues. Elle est impliquée dans la génération de granules de sécrétion et dans la rétention des facteurs qui s'y trouvent, tels que des chimiokines, des cytokines et le granzyme B. Elle peut ainsi potentialiser leur activité en les protégeant et en les accompagnant vers leurs cibles (Pejler *et al.*, 2009). Par ce fait, elle a été impliquée dans les maladies inflammatoires telles que les coronaropathies, les rhumatismes et la dermatomyosite (Scully *et al.*, 2012). La serglycine est également impliquée dans les cancers. En effet, il a été montré qu'elle était surexprimée chez des patients atteints de myélomes multiples et qu'elle favorisait le développement des tumeurs, mais par l'intermédiaire de ses chaînes CS (Purushothaman & Toole, 2014). De plus, elle est un biomarqueur des leucémies myéloïdes chroniques (Niemann *et al.*, 2007). Son activité pro-tumorale a d'ailleurs été associée à son rôle dans l'inflammation (Korpetinou *et al.*, 2014).

B. Les HSPGs membranaires

On peut classer les HSPGs membranaires en deux groupes selon la manière dont ils sont liés à la membrane. Les HSPGs du premier groupe traversent intégralement la bicouche lipidique *via* un seul domaine transmembranaire : ils sont représentés par les syndécans-1 à 4, par un variant du CD44 et par le bétaglycan. Les HSPGs du second groupe sont fixés à la membrane *via* une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol) : il s'agit des glypicans-1 à -6 (Iozzo & Schaefer, 2015).

1. Les HSPGs transmembranaires

a. Les syndécans

Le nom « syndécan » vient du mot grec « *syndein* » qui signifie « lier ensemble ». C'est ainsi que la dénomination « syndécan » a été proposée pour ces protéoglycanes, car ils peuvent connecter la surface de la cellule aux composants de la MEC. Ils sont impliqués dans les processus d'adhérence cellulaire et dans l'établissement de l'architecture des matrices. Ils participent également à la mise en place des complexes de signalisation. Ils interviennent donc dans la prolifération et la migration cellulaires (Bernfield *et al.*, 1999 ; Iozzo & Schaefer, 2015).

La famille des syndécans est représentée par 4 membres qui sont les produits de 4 gènes distincts : le syndécan-1, le syndécan-2 ou fibroglycan, le syndécan-3 ou N-syndécan, le syndécan-4 ou amphiglycan. Il s'agit de protéines transmembranaires de type I qui ont une masse moléculaire comprise entre 20 et 45 kDa. Ils sont tous constitués de trois domaines qui ont des propriétés distinctes : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Figure 5) (Tkachenko *et al.*, 2005). Ils portent tous des chaînes HS. En outre, les syndécans-1 et -3 peuvent porter des chaînes CS au niveau des sites de glycosylation proches de la membrane plasmique (Ueno *et al.*, 2001 ; Pap & Bertrand, 2013).

Parmi les trois domaines composant le *core* protéique des syndécans, le domaine extracellulaire est celui qui est le moins conservé avec seulement 10 à 20% d'homologie. Il a été montré que ce domaine était intrinsèquement désordonné, ce qui donnait aux syndécans une grande flexibilité structurale pour interagir avec de nombreuses protéines. Il contient des séquences Ser-Gly nécessaires pour la liaison des GAGs, majoritairement des HS. Il contient également des séquences reconnues par des protéases telles que la thrombine, l'élastase ou les MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) impliquées dans leur clivage, ou *shedding* : ils peuvent donc être présents sous forme soluble. D'ailleurs, les syndécans clivés peuvent être des inhibiteurs de la signalisation cellulaire (Choi *et al.*, 2010). Le domaine transmembranaire est au contraire très conservé et constitué d'acides aminés majoritairement hydrophobes. Il contient un motif GXXXG (où G est de la glycine et X un acide aminé non défini) impliqué dans l'homo ou l'hétérodimérisation des syndécans et les interactions avec des récepteurs membranaires (Dews & Mackenzie, 2007). Les domaines intracellulaires des 4 syndécans sont également très conservés puisqu'ils présentent 60 à 70% d'homologie de séquence. Ils sont constitués de trois régions appelées C1, V, et C2 (Figure 5). La région C1 est hautement conservée et impliquée dans l'interaction avec des protéines qui font le lien avec les filaments d'actine. La région V est variable : elle est spécifique à chaque syndécan. La région C2 est également très conservée : elle contient une séquence consensus impliquée dans l'interaction avec des protéines à domaine PDZ comme la synectine, la synténine ou la synbindine (Alexopoulou *et al.*, 2007).

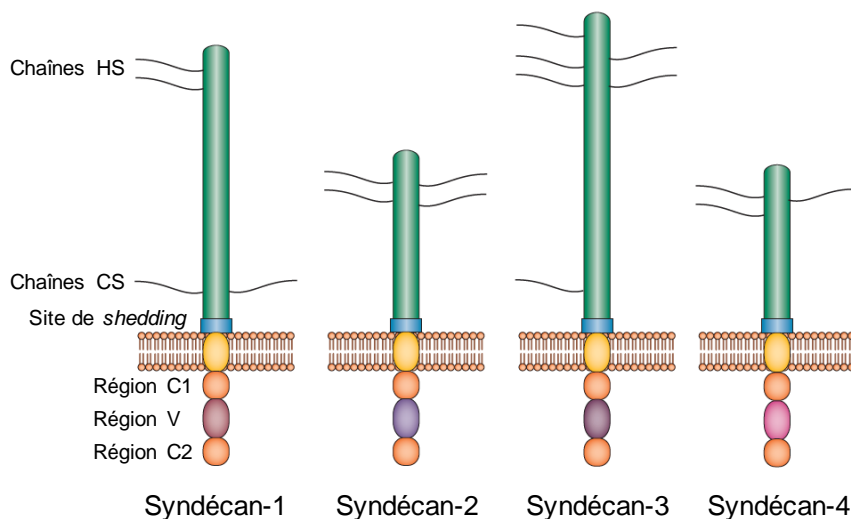


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des syndécans. Le domaine extracellulaire est en vert, la zone qui subit le clivage par les protéases est indiquée par un rectangle bleu, le domaine transmembranaire est en jaune et les régions conservées C1 et C2 sont en orange. La région V, spécifique à chaque syndécan, est indiquée dans une couleur par protéine. D'après Pap & Bertrand, 2013.

L'expression des différents syndécans est variable et dépend du type cellulaire et de l'environnement. Ainsi, les niveaux d'expression du syndécan-1 sont très importants chez les cellules épithéliales mais aussi chez les plasmocytes, les macrophages, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules cancéreuses. Il joue essentiellement un rôle dans l'organisation des matrices *via* les interactions qu'il établit avec la laminine et le collagène (Alexopoulou *et al.*, 2007 ; Stepp *et al.*, 2015).

Le syndécan-2 est majoritairement exprimé par les cellules mésenchymateuses, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Essner *et al.*, 2006). En plus de ses fonctions d'interaction avec les composants des matrices, il est impliqué dans l'angiogenèse. Ainsi, l'invalidation de l'expression du syndécan-2 chez des cellules endothéliales de souris conduit à une inhibition de leur motilité et à une diminution de la formation des capillaires (Fears *et al.*, 2006). Il est également impliqué dans la régulation de la prolifération et de l'adhérence en jouant le rôle de co-récepteur pour différents facteurs de croissance (Mansouri *et al.*, 2015).

Le syndécan-3 est majoritairement exprimé par les cellules du système nerveux. Il sert de co-récepteur à plusieurs facteurs intercellulaires comme HB-GAM (*Heparin Binding Growth-Associated Molecule*), le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor*), l'AgRP (*Agouti-Related Protein*) ou le GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*) (Tkachenko *et al.*, 2005 ; Bespalov *et al.*, 2011 ; Reizes *et al.*, 2013).

Enfin, le syndécan-4 est ubiquitaire mais ses niveaux d'expression sont globalement plus faibles que ceux des autres syndécans (Alexopoulou *et al.*, 2007). Il est essentiellement impliqué dans l'adhérence cellulaire, les interactions cellules-matrices et la réorganisation du cytosquelette. C'est le seul syndécan qui est retrouvé au niveau des plaques focales

d'adhérence (Woods & Couchman, 2001). En outre, il a des fonctions de co-récepteur aux facteurs de croissance et est impliqué dans leur endocytose. Il a en effet été démontré que le syndécan-4 était nécessaire à l'internalisation du FGF-2 d'une manière indépendante de la clathrine et de la dynamine (Tkachenko *et al.*, 2004). Il peut aussi être retrouvé au niveau de radeaux lipidiques, suggérant son implication dans l'activation de certaines voies de signalisation (Tkachenko & Simons, 2002).

b. Le CD44

Le CD44 est un protéoglycane transmembranaire qui peut exister sous différentes formes en raison d'un processus d'épissage alternatif. Son gène est composé de 5 exons standards (S), 10 exons variables (V), puis à nouveau 5 exons standards (Figure 6A). Alors que les exons standards sont toujours présents dans l'ARNm, les exons variables retrouvés dans le transcrit primaire peuvent subir différents épissages alternatifs. Ils ne sont pas forcément traduits, ce qui donne lieu à de multiples combinaisons et donc à l'existence de plusieurs variants du CD44 (Figure 6B). La forme la plus courante est néanmoins la forme standard dépourvue d'exons variables. Toutes les isoformes sont modifiées par l'ajout de plusieurs *N*- et *O*-glycanes (Zoller *et al.*, 2011). Bien que 7 motifs Ser-Gly soient retrouvés le long de la séquence protéique, seuls 2 d'entre eux sont des sites de liaison aux GAGs. Le premier se situe dans l'exon S5 et est relié à une chaîne CS. Le second, codé par l'exon V3, est le seul site de liaison aux HS. Ainsi, seuls les variants traduits à partir d'un ARNm portant l'exon V3 peuvent lier des HS. On parle dans ce cas de CD44v3 (Greenfield *et al.*, 1999).

Les différentes isoformes du CD44 sont organisées en 3 domaines : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Figure 6C). Le domaine extracellulaire, du côté N-terminal, contient des motifs de liaison à l'AH, à plusieurs autres composants de la MEC, et à différents facteurs de croissance et chimiokines. Le domaine cytoplasmique est nécessaire à la transduction de signaux en interagissant notamment avec les SFK (*Src Family Kinases*) (Dzwonek & Wilczynski, 2015). Grâce à ses chaînes HS, le CD44v3 peut interagir avec de nombreux médiateurs protéiques comme le FGF-2 ou l'HB-EGF (Bennett *et al.*, 1995). Son interaction avec ces facteurs favorise l'induction de leurs signalisations associées. Par exemple, l'interaction entre le CD44v3 et le HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) se fait *via* les chaînes HS et conduit à l'activation du récepteur c-Met (van der Voot *et al.*, 1999). Les HS des formes CD44v3 sont également nécessaires à l'activité de la chimiokine MIP-1 β (*Macrophage Inflammatory Protein*) et donc au recrutement et à l'activation des lymphocytes (Tanaka *et al.*, 1993). Le CD44v3 a aussi été associé à la progression tumorale, en favorisant notamment l'extravasation et la migration des cellules métastatiques (Wielanga *et al.*, 2000 ; Zoller *et al.*, 2015).

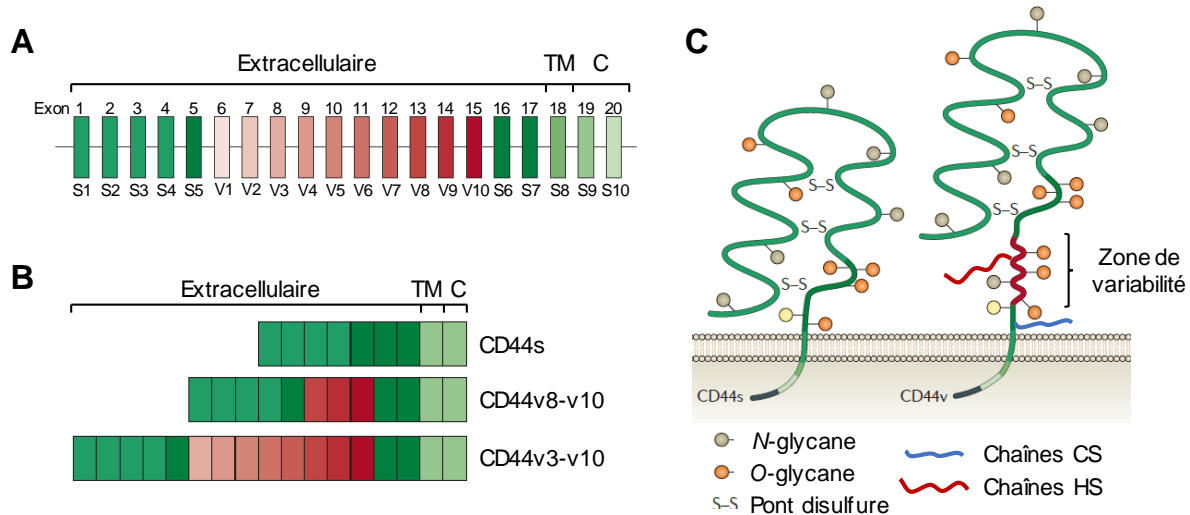


Figure 6 : Structure du gène codant le CD44 et de la protéine. (A) Organisation du gène du CD44. Le gène du CD44 est composé de répétition d'exons standards (S) et d'exons variables (V) qui peuvent subir un épissage alternatif. Le domaine transmembranaire (TM) est codé par l'exon S8 et le domaine cytoplasmique (C) par les exons S9 et S10. (B) Exemples de variants d'épissage du CD44. (C) Représentation schématique de la structure de l'isoforme standard CD44s, qui est la forme la plus petite et la plus commune, et d'une isoforme exprimant des exons variables. D'après Zoller *et al.*, 2011.

c. Le bétaglycan

Le bétaglycan a été isolé puis cloné en 1991 (Lopez-Casillas *et al.*, 1991 ; Wang *et al.*, 1991). Il a alors été identifié comme étant le récepteur de type III du TGF- β (*Transforming Growth Factor*), mais est également capable de fixer d'autres membres de la famille de ce facteur (Lewis *et al.*, 2000). Il contient un domaine cytoplasmique, un domaine membranaire et un domaine extracellulaire (Figure 7) (Bilandzic & Stenvers, 2011). Le domaine intracellulaire est relativement court et contient plus de 40% de sérines et de thréonines organisées en séquences Ser-Thr. Certains de ces résidus peuvent être phosphorylés par la PKC (Protéine Kinase C). Il contient également une séquence de trois acides aminés à l'extrémité C-terminale qui est un motif de liaison aux séquences PDZ (Bilandzic & Stenvers, 2011). Le domaine extracellulaire comporte différents sites de liaisons aux GAGs. A ce titre, le bétaglycan peut être lié à des chaînes HS ou CS. Non loin de la membrane plasmique, on y trouve également une séquence reconnue par les protéases. Le bétaglycan peut ainsi subir un *shedding* par l'action du granzyme B et de ce fait relâcher une forme active du TGF- β (Boivin *et al.*, 2012). De plus, il contient une zone particulière appelée ZP (*Zona Pellicula*). La région ZP est normalement caractéristique des protéines riches en cystéines composées de deux parties et leur permet de s'assembler en longues fibrilles (Lin *et al.*, 2011). Dans le cas du bétaglycan, cette région ZP sert de co-récepteur membranaire pour les membres de la famille du TGF- β (Diestel *et al.*, 2013).

Par son interaction avec le TGF- β , le bétaglycan est impliqué dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. Il favorise la production de cytokines pro-inflammatoires (Bernabeu

et al., 2009), et est impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) lors de l'embryogenèse (Brown *et al.*, 1999). En outre, il est aussi capable de lier les BMP-2, -4 et -7 (*Bone Morphogenic Protein*) pour augmenter leur signalisation, ce qui favorise notamment la différenciation cellulaire (Kirkbride *et al.*, 2008). Pour comprendre le rôle du bétaglycan *in vivo*, des expériences ont été menées avec des souris invalidées pour son expression. Dès le 13^{ème} jour de développement embryonnaire, ces souris présentent des défauts létaux de prolifération au niveau des tissus cardiaque et hépatique (Stenvers *et al.*, 2003). Ces données montrent que le bétaglycan joue un rôle essentiel et non redondant au cours du développement.

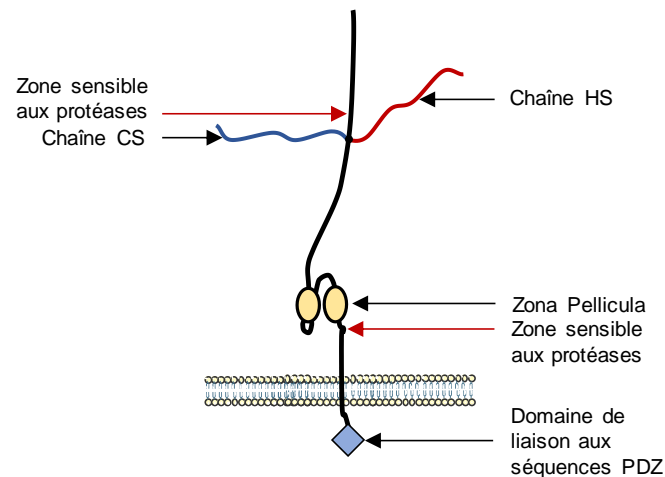


Figure 7 : Représentation schématique de la structure du bétaglycan. D'après Iozzo & Schaefer, 2015.

2. Les HSPGs fixés à la membrane par une ancre GPI

Les glypicans sont des HSPGs liés à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI. Ils n'ont donc pas de domaine transmembranaire ni cytoplasmique. Leur *core* protéique a une masse comprise entre 60 et 70 kDa. La famille des glypicans est représentée par 6 membres, les glypicans-1 à -6, qui sont chacun le produit de 6 gènes distincts. Ils portent tous des chaînes HS. Le glypican-5 peut, en plus, porter des chaînes CS (Filmus *et al.*, 2008).

Bien que la structure tertiaire des glypicans ait fait l'objet de peu d'étude, il est établi qu'ils présentent tous deux mêmes caractéristiques structurales. D'une part, ils possèdent en commun 14 résidus de cystéine conservés, engagés dans plusieurs ponts disulfures (Veugelers *et al.*, 1999). Après leur biosynthèse, les glypicans sont sujets à l'action de protéases qui génèrent deux sous-unités, lesquelles sont ensuite reliées grâce à la formation de ces ponts disulfures. D'autre part, les sites de liaison aux GAGs se trouvent dans une zone proche de la membrane plasmique, à la différence des syndécans. Cette propriété leur permet d'interagir avec différentes molécules présentes à la surface des cellules en plus des facteurs de croissance et autres médiateurs protéiques (Filmus *et al.*, 2008). Ils peuvent également servir de substrat à une lipase extracellulaire, appelée Notum, qui clive l'ancre GPI pour les relarguer dans le milieu extracellulaire (Filmus & Capurro, 2014).

L'association particulière des glypicans à la membrane *via* leur ancre GPI favorise leur localisation au niveau des radeaux lipidiques, ce qui permet l'activation de certaines voies de signalisation (Paulick & Bertozzi, 2008). De plus, la présence de l'ancre GPI peut orienter l'internalisation vers des voies de recyclage spécifiques, permettant des modifications structurales de leurs chaînes de GAGs (Cheng *et al.*, 2002). Les glypicans sont tous impliqués dans diverses fonctions physiologiques grâce à leurs capacités à interagir avec un grand nombre de facteurs de croissance et autres morphogènes. Toutefois, certains ont des fonctions qui leur sont propres. À l'image des syndécans, l'expression des glypicans dépend du type cellulaire et de l'environnement (Tableau 2) (Fransson *et al.*, 2004).

Tableau 2 : Expressions des glypicans chez l'embryon et l'adulte.

D'après Fransson *et al.*, 2004.

Nom	Expression	
	Chez l'embryon	Chez l'adulte
Glypican-1	SNC	Ubiquitaire
Glypican-2	SNC	Absent
Glypican-3	Ubiquitaire	SNC uniquement
Glypican-4	Reins Certains neurones	SNC uniquement
Glypican-5	Reins - SNC Bourgeons de membres	SNC uniquement
Glypican-6	Cœur - Foie - Reins	Cœur - Foie - Reins Ovaires - Intestins

Le glypican-1 interagit essentiellement avec le FGF-2. Il est donc fortement impliqué dans la prolifération cellulaire et la survie (Fransson *et al.*, 2004). Il est également nécessaire à l'internalisation de polyamines grâce à ses chaînes HS très sulfatées (Fransson *et al.*, 2004). Le glypican-2, ou cérébroglycan, n'étant exprimé que dans le SNC embryonnaire, il y exerce une fonction très spécifique. Il intervient dans la migration des neurones et l'orientation des axones au cours du développement (Kurosawa *et al.*, 2001). Le glypican-3 est particulièrement connu pour intervenir dans la modulation de l'activité des protéines Wnt (*Wingless-integrated*), de Hedgehog, des FGFs et des BMPs, quatre voies impliquées dans la formation des os. Il joue un rôle prépondérant lors de la chondrogenèse et l'ostéogenèse des os longs au cours du développement (Dwivedi *et al.*, 2013). Le glypican-4, ou K-glypican, a été décrit pour participer à la régulation du métabolisme cellulaire, en interagissant notamment avec le récepteur de l'insuline. Il favorise également la différenciation des adipocytes et pourrait être impliqué dans le développement de l'obésité (Tamori *et al.*, 2013 ; Ussar *et al.*, 2012). Les fonctions des glypican-5 et glypican-6 sont encore mal connues, outre le fait qu'ils participent tous deux à la fixation de facteurs de croissance et de morphogènes. Aucune étude utilisant des souris

knock-out pour l'expression de l'un ou l'autre de ces HSPGs n'a été réalisée (Dwivedi *et al.*, 2013).

C. Les HSPGs péricellulaires

Les HSPGs dits péricellulaires sont situés dans la lame basale qui est une matrice particulière. Elle sert de frontière à la croisée des cellules épithéliales, endothéliales ou musculaires, et des tissus conjonctifs sous-jacents. Elle est formée par plusieurs protéines en interaction telles que les laminines, la fibronectine, le collagène de type IV et des protéoglycanes dont des HSPGs représentés par le perlécan, l'agrine, et le collagène de type XVIII (Iozzo & Schaefer, 2015).

1. L'agrine

L'agrine est un HSPG dont le *core* protéique a une masse moléculaire de 200 kDa et est organisé de manière multimodulaire. Elle est ubiquitaire et surtout retrouvée au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, mais aussi au niveau des poumons, des reins, des muscles, du foie et de la glande thyroïdienne. Il existe deux variants d'épissage de l'agrine : le premier est sécrété alors que le second est retrouvé au niveau de la membrane plasmique (Burgess *et al.*, 2000). L'agrine contient plusieurs séquences consensus Ser-Gly qui permettent à trois chaînes HS de se lier au *core* protéique. Les sites de liaisons aux HS sont localisés dans les régions N-terminale et centrale (Denzer *et al.*, 1998).

L'agrine peut interagir avec le FGF-2, la thrombospondine, le peptide β -amyloïde et la N-CAM par l'intermédiaire de ses chaînes HS (Burgess *et al.*, 2002). Ainsi, en plus de ses fonctions de structuration de la lame basale, l'agrine est impliquée dans le développement des neurones à plusieurs niveaux. C'est d'ailleurs en partie grâce à son interaction avec la N-CAM qu'elle intervient dans le développement des axones (Cotman *et al.*, 1999). Elle permet la formation des synapses et la différenciation post-synaptique en régulant l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine. C'est de cette propriété que lui vient son nom : agrine provenant du mot grec « ageirein » qui signifie rassembler (Erickson & Couchman, 2000 ; McCarthy, 2015). D'autre part, la forme transmembranaire de l'agrine participe au développement des filipodes d'une manière dépendante des HS. En effet, la mutation des acides aminés nécessaires à la liaison des HS diminue drastiquement leur formation (Lin *et al.*, 2010). Enfin, la forme membranaire de l'agrine joue un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire. A l'image de son rôle dans l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine, l'agrine peut induire l'agrégation des radeaux lipidiques et des TCR (*T-Cell Receptor*), ce qui régule l'activation des cellules T (Jury & Kabouridis, 2010).

2. Le perlécan

Le perlécan est un HSPG qui a un *core* protéique d'une masse moléculaire d'environ 400 kDa. Il s'agit d'une protéine linéaire dont la structure consiste en un enchainement de régions globulaires. C'est pour cette raison qu'il présente une structure en collier de perles lorsqu'il est observé en microscopie électronique (Hassell *et al.*, 2002). Il est composé de 5 domaines (Figure 8). Le domaine I N-terminal contient trois sites de liaison pour des chaînes HS. Les domaines II et III possèdent des homologies de séquence avec la région de liaison du récepteur des LDL et avec un domaine de la laminine A, respectivement. Le domaine IV est le plus grand et contient 21 motifs *IgG-like*. Quant au domaine V, il contient des domaines de type laminine séparés par des séquences *EGF-like* (Chen *et al.*, 2008).

Le perlécan est ubiquitaire et majoritairement retrouvé au niveau des matrices des organes vascularisés (Melrose *et al.*, 2004). Il établit de nombreuses interactions avec différents partenaires protéiques dans la lame basale, tels que les laminines, l'élastine ou le collagène de type IV, et participe donc à son assemblage et au maintien de son intégrité (McCarthy, 2015). Les souris déficientes en perlécan présentent des chondrodysplasies périnatales et létales. Des analyses histologiques par microscopie électronique ont montré que ces anomalies étaient dues à un défaut de formation des membranes basales. Les souris survivantes souffrent de dysplasie du squelette avec les os longs plus courts et des malformations du crâne, de la face, du cerveau et du cœur. Elles meurent peu après leur naissance (Costell *et al.*, 1999). De même, des mutations dans le gène codant pour le perlécan chez l'Homme sont associées à des phénotypes cliniques pouvant être très sévères, allant d'anomalies de développement du squelette à la mort du nouveau-né (Arikawa-Hirasawa *et al.*, 2002). Comme le perlécan est présent au niveau des tissus vascularisés, il est impliqué dans le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux sanguins en favorisant l'angiogenèse (Farach-Carson *et al.*, 2014). Enfin, il piège de nombreux facteurs de croissance dans ses chaînes HS, jouant le rôle de réservoir bioactif. Le clivage de ses chaînes peut alors réguler l'adhérence et la prolifération cellulaires (Iozzo, 2005).

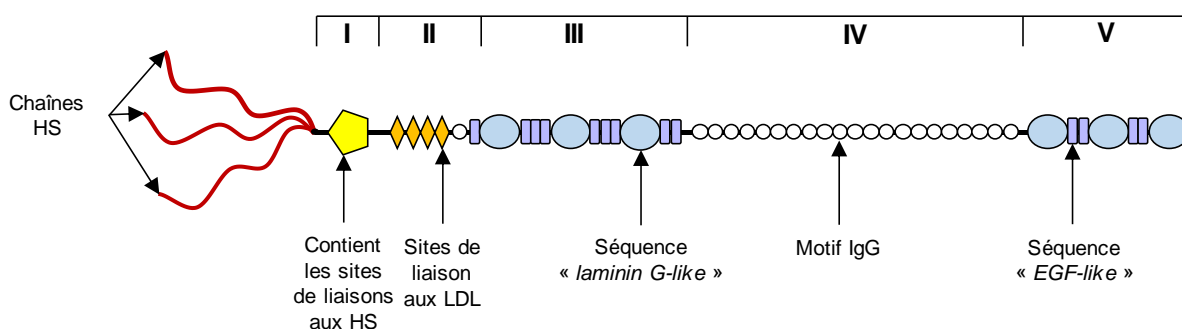


Figure 8 : Représentation schématique du perlécan. D'après Iozzo & Schaefer, 2015.

3. Le collagène XVIII

Le collagène XVIII appartient à la famille des multiplexines (Halfter *et al.*, 1998). Il possède à la fois les caractéristiques des protéoglycanes et des collagènes. Sa région centrale est organisée en triple hélice et composée de 10 séquences de type collagène intercalées. Sa partie C-terminale présente un domaine de trimérisation, nécessaire à la formation des complexes présents dans les lames basales, précédée d'un domaine particulier à son extrémité appelé endostatine. Il contient également trois séquences consensus Ser-Gly qui sont les trois sites de liaison des HS (Figure 9). Des variations d'épissage du transcrit primaire conduisent à la synthèse de trois variants différents du collagène XVIII : le premier est une forme courte ; le second contient un domaine *thrombospondine-like* (*TSP-like*) en plus dans sa partie N-terminale ; et le troisième contient des répétitions de séquences qui présentent une homologie avec les protéines de la famille Frizzled en amont du domaine *TSP-like* (Dong *et al.*, 2003 ; Iozzo & Schaefer, 2015).

Le collagène XVIII est ubiquitaire et très souvent retrouvé dans les lames basales des tissus vasculaires et épithéliaux. Il a un rôle bien défini dans le maintien des matrices et dans l'angiogenèse. Chez l'Homme, des mutations dans le gène codant le collagène XVIII sont à l'origine du syndrome de Knobloch, défini par une myopie sévère, un détachement et une dégénération de la rétine (Sertié *et al.*, 2000 ; Suzuki *et al.*, 2002). De plus, il a été suggéré que la forme longue du collagène XVIII pouvait être associée au développement de la maladie d'Alzheimer (van Horsen *et al.*, 2002).

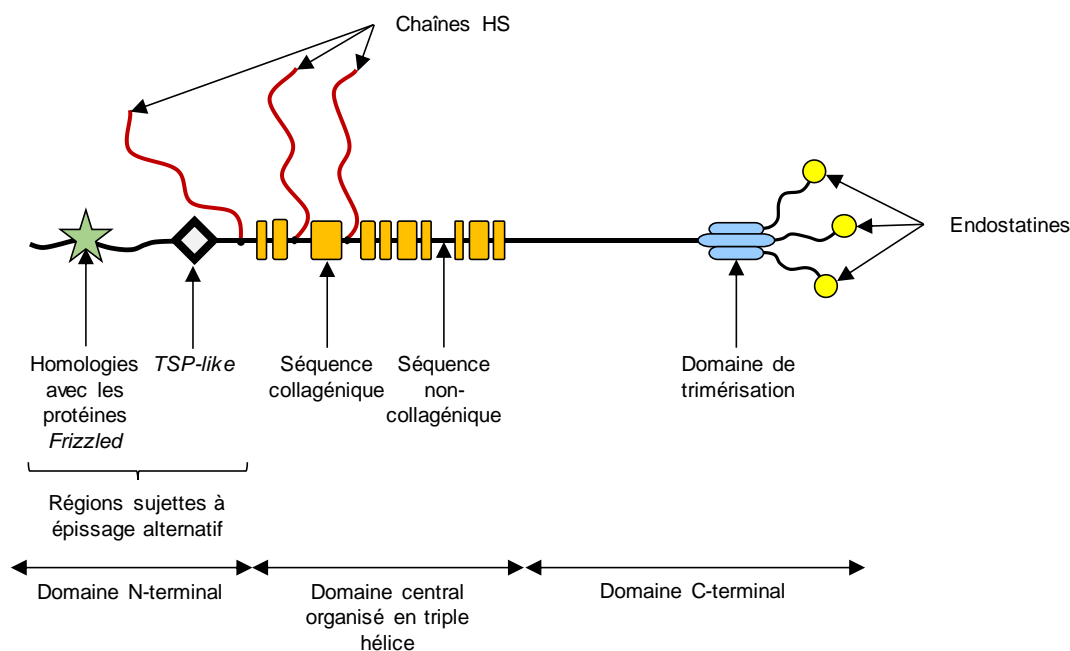


Figure 9 : Représentation schématique du collagène XVIII. D'après Iozzo & Schaefer, 2015.

D. Les HSPGs extracellulaires de type SPOCK

Les HSPGs extracellulaires sont représentés par la famille SPOCK, composée des testicans-1 à -3. Il existe des homologies élevées entre les séquences de ces protéines et celles des protéines de la familles SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*), d'où le nom SPOCK attribué à la famille : *SPARC/Osteonectin CWCV and Kazal-like domain proteoglycans*. Leur structure, similaire à celles du perlécan et de l'agrine, comporte 5 domaines (Figure 10) : le domaine I est un domaine très conservé parmi les trois testicans ; le domaine II est un domaine riche en cystéines homologue à la follistatine ; le domaine III est un domaine de liaison au calcium qui partage une homologie avec le domaine de liaison au calcium des protéines SPARC ; le domaine IV, assez court, est un domaine *thyroglobulin-like* ; et le domaine V correspond au domaine C-terminal, il contient deux sites de liaison pour les chaînes HS (Iozzo & Schaefer, 2015).

Même si les testicans ont initialement été isolés à partir de liquide séminal, ils sont en fait exprimés quasi exclusivement dans le système nerveux central (SNC). Le testican-1 est présent au niveau de la zone post-synaptique des cellules pyramidales de l'hippocampe (Bonnet *et al.*, 1996). Le testican-2 est localisé dans diverses régions riches en neurones dans le cervelet et le cerveau. Il est également exprimé au niveau des poumons et des testicules (Vannahme *et al.*, 1999). Le testican-3 est exprimé dans l'ensemble du SNC (Hartmann *et al.*, 2013). Ces HSPGs sont essentiellement impliqués dans la régulation du développement neuronal. Par exemple, une mutation faux sens a été identifiée dans le gène codant le testican-1 chez l'Homme et est à l'origine d'un retard de développement du SNC. Les malades présentent une microcéphalie associée à un retard mental important (Dhamija *et al.*, 2014). De même, des souris déficientes en testican-3 présentent un développement anormal du SNC, ce qui est en relation avec une perturbation de leur comportement (Yamamoto *et al.*, 2014).

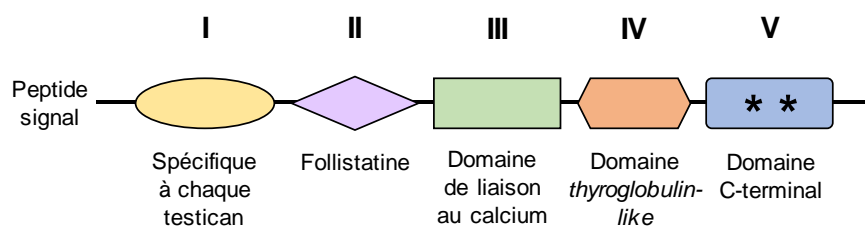


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation des domaines des HSPGs de la famille SPOCK. Les cinq domaines sont indiqués dans l'ordre depuis l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Le domaine V comporte deux sites de liaison aux HS qui sont matérialisés par des astérisques. D'après Iozzo & Schaefer, 2015.

PARTIE 2 : LA BIOSYNTHESE DES HEPARANES SULFATES

La biosynthèse des HS est un processus complexe et finement régulé. Elle est réalisée essentiellement dans l'appareil de Golgi et peut être décomposée en trois étapes : l'initiation, qui correspond à la synthèse d'un tétrasaccharide faisant la liaison entre le *core* protéique et la chaîne polysaccharidique ; l'élongation, étape pendant laquelle la chaîne est polymérisée ; et la maturation, qui correspond à la modification de la chaîne polysaccharidique par épimérisation des résidus d'acides uroniques et/ou sulfatation à différentes positions des disaccharides.

I. Initiation

A. Formation de l'amorce tétrasaccharidique

La biosynthèse des HS débute dans le réticulum endoplasmique et se poursuit dans l'appareil de Golgi. La première étape correspond à la formation d'une amorce tétrasaccharidique, aussi appelée tétrasaccharide de liaison, dont la séquence est GlcUA-(β 1,3)-Gal-(β 1,3)-Gal-(β 1,4)-Xyl-(β 1), le résidu de xylose étant lié à une sérine du *core* protéique. Ce tétrasaccharide est commun aux HS et aux CS/DS. Même si aucune séquence consensus de liaison des HS aux protéines n'a été définie, les résidus de sérine impliqués dans la liaison aux tétrasaccharides de liaison font très souvent partie de motifs Ser-Gly (Kreuger & Kjellén, 2012 ; Mikami *et al.*, 2013).

Le résidu de xylose est transféré sur la fonction hydroxyle de la sérine par l'action des xylosyl-transférases-I ou -II (XylT-I ou XylT-II) à partir du nucléotide sucre UDP-Xyl. Les galactosyl-transférases-I et -II (β 4GalT7 et β 3GalT6) transfèrent ensuite successivement les deux résidus de galactose à partir du même substrat donneur, l'UDP-Gal. Enfin, la glucuronyl-transférase-I (GlcAT-I) est responsable de l'ajout du dernier monosaccharide formant l'amorce, lequel est transféré à partir d'un UDP-GlcUA (Figure 11) (Schön *et al.*, 2006 ; Kreuger & Kjellén, 2012).

B. Modifications de l'amorce

L'amorce oligosaccharidique peut ensuite subir diverses modifications : le résidu de xylose peut être phosphorylé en position C2 (Fransson *et al.*, 1985), quand les résidus de galactose peuvent être sulfatés (Kitagawa *et al.*, 2008). Même si les fonctions exactes de ces modifications ne sont pas encore clairement établies, elles pourraient orienter la machinerie de biosynthèse pour aboutir à une chaîne HS ou une chaîne CS/DS (Ueno *et al.*, 2001).

La phosphorylation du xylose est réalisée dans l'appareil de Golgi par la kinase FAM20B (*Family with sequence similarity 20 member B*). Cette modification est commune aux HS et

aux CS/DS. Il a été observé que la surexpression de FAM20B en cellules HeLa était associée à une augmentation de la quantité globale de HS et de CS tandis que son invalidation a les effets inverses, suggérant que cette enzyme est impliquée dans la régulation de la biosynthèse de ces deux familles de GAGs (Koike *et al.*, 2009). Plusieurs études suggèrent en outre que la 2-*O*-phosphorylation du xylose pourrait être à l'origine de régulations très fines de l'initiation de la biosynthèse des HS et CS. En effet, il a été montré que les résidus 2-*O*-phosphorylés favorisaient le transfert du deuxième résidu de Gal ainsi que du résidu de GlcUA en augmentant l'activité des β 3GalT6 et GlcAT-I (Tone *et al.*, 2008). Cependant, ils ont l'effet inverse sur la β 4GalT7 qui ne les reconnaît pas en tant que substrat. Ils pourraient donc entraîner l'arrêt de la biosynthèse des GAGs (Gulberti *et al.*, 2005). La phosphorylation du xylose est pourtant nécessaire à la formation du tétrasaccharide puisque des cellules déficientes en FAM20B présentent un oligosaccharide de liaison tronqué qui ne peut pas être ensuite allongé (Wen *et al.*, 2014). Cette modification pourrait donc se comporter comme un interrupteur de la synthèse des HS et sa cinétique serait cruciale. Un tétrasaccharide de liaison en cours de synthèse ne devrait donc subir une telle modification qu'après l'ajout du premier résidu de Gal. Cela étant, il a été montré que cette modification était réversible grâce à l'action de la 2-phosphoxylose phosphatase XYLP, et que la déphosphorylation du xylose concorde avec l'ajout du résidu de GlcUA (Koike *et al.*, 2014).

La sulfatation des résidus de galactose n'est pas aléatoire et dépend du résidu impliqué. Le premier résidu de Gal peut être sulfaté en position 6 tandis que le deuxième est sulfaté en position 4. La sulfatation en C6 permet l'établissement d'interaction avec la GlcAT-I pour favoriser son activité (Tone *et al.*, 2008). Ces modifications n'étant retrouvées que sur les chaînes de CS/DS, il semblerait qu'elles soient à l'origine du type de GAG synthétisé (Ueno *et al.*, 2001), en régulant l'activité des enzymes de biosynthèse des CS (Gulberti *et al.*, 2012).

II. Elongation

Une fois l'amorce tétrasaccharidique synthétisée, la polymérisation de la chaîne HS débute par le transfert d'un résidu de GlcNAc sur le résidu de GlcUA grâce aux enzymes de la famille EXTL (*Exostosin-Like glycosyl-transferase*), composée de EXTL1, EXTL2 et EXTL3, qui ont une activité *N*-acétylglucosaminyl-transférase. C'est l'action de ces enzymes qui commande la poursuite de la synthèse des HS, et non celle des CS. La chaîne est ensuite allongée par additions successives de l'unité disaccharidique [GlcUA-(β 1,4)-GlcNAc(α 1,4)] réalisées par les enzymes de la famille EXT (*Exostosin glycosyl-transferases*), qui est représentée par EXT1 et EXT2 (Figure 11). Initialement, on pensait que l'ensemble de l'étape d'élongation des chaînes HS était réalisé par les enzymes EXT1 et EXT2. La famille EXTL n'a été identifiée que dans un second temps (Sugahara & Kitagawa, 2002 ; Busse-Wicher *et al.*, 2014).

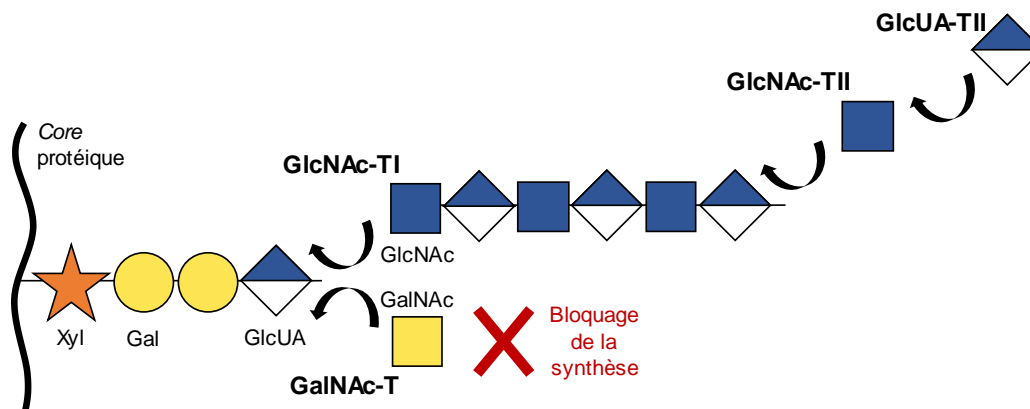


Figure 11 : Représentation schématique des différentes activités enzymatiques nécessaires à la polymérisation des chaînes HS. D'après Busse-Wicher *et al.*, 2014.

A. Les exostosine glycosyltransférases

La famille des EXT est représentée par deux membres chez les mammifères, EXT1 et EXT2, dont l'expression est ubiquitaire. A l'origine, ces deux enzymes ont été associées à l'HME (*Hereditary Multiple Exostoses*), une maladie caractérisée par des excroissances osseuses (Solomon *et al.*, 1964 ; Cook *et al.*, 1993 ; Le Merrer *et al.*, 1994). Ce n'est que plus tard qu'il a été montré que les EXT intervenaient durant la biosynthèse des HS (Lind *et al.*, 1998 ; McCormik *et al.*, 1998). Il s'agit de deux protéines transmembranaires de types II composées de 746 et 718 acides aminés, respectivement. Elles présentent toutes deux un court domaine cytoplasmique au niveau de leur extrémité N-terminale et un domaine transmembranaire de 17 acides aminés. Leur partie C-terminale est globulaire et organisée en plusieurs domaines conservés dont les fonctions ne sont pas toutes établies. Elles possèdent des motifs DXD nécessaires à la fixation des nucléotides-sucres. Par ailleurs, elles présentent plusieurs séquences riches en cystéines espacées de la même manière, suggérant que leur structure tertiaire est similaire (Busse-Wicher *et al.*, 2014). Les mécanismes à l'origine de la régulation de leur expression ne sont pas connus.

Au sein de l'appareil de Golgi, l'association de EXT1 avec EXT2 pour former un complexe est nécessaire à leur activité biologique (Kobayashi *et al.*, 2000 ; McCormick *et al.*, 2000). Bien qu'il soit établi qu'elles présentent toutes deux à la fois une activité *N*-acétylglucosaminyl-transférase (GlcNAc-TII) et une activité glucuronyl-transférase (GlcUA-TII) *in vitro*, seul le site catalytique portant l'activité GlcUA-TII de EXT1 a été identifié. Il se situe au niveau de la région N-terminale de la protéine (Wei *et al.*, 2000).

Des études fonctionnelles ont montré que l'inactivation d'expression de EXT1 et EXT2 par ARN interférence donne lieu à la synthèse de chaînes HS plus courtes (Busse *et al.*, 2007). A l'inverse, une augmentation très importante des activités enzymatiques GlcNAc-T et GlcUA-T a été observée après co-transfection de ces deux enzymes dans les mêmes cellules (Senay *et al.*, 2000). Cependant, seule EXT1 semble primordiale à la biosynthèse des HS. En effet, il

a été observé que des cellules chez lesquelles l'expression de EXT1 a été abolie ne sont plus capables de synthétiser des HS, et plus aucune activité de polymérisation n'y est détectable (Wei *et al.*, 2000). Il a aussi été montré que la surexpression de EXT1 conduisait à l'augmentation des activités GlcNAc-T et GlcUA-T (Lind *et al.*, 1998). A ce jour, le rôle d'EXT2 est moins clair. La surexpression de EXT2 chez des cellules déficientes en EXT1 ne permet pas de rétablir la synthèse des HS (McCormick *et al.*, 2000). De plus, si la surexpression de EXT1 conduit à la synthèse de chaînes plus longues, la surexpression de EXT2 n'a pas d'effet sur la longueur des chaînes HS synthétisées (Busse *et al.*, 2007). Par ailleurs, même si ces deux polymérases possèdent les mêmes activités enzymatiques, des données montrent qu'elles exercent des fonctions qui ne sont pas redondantes. Lorsqu'une EXT est surexprimée alors que l'autre est absente, elle reste localisée dans le RE, indiquant que la présence des deux enzymes est indispensable à leur localisation golgienne et donc à leur bon fonctionnement (McCormick *et al.*, 2000).

B. Les exostosines-like glycosyltransférases

La famille des enzymes EXTL est représentée par trois membres (EXTL1, EXTL2, EXTL3). Il s'agit de protéines constituées de 676, 330 et 919 acides aminés, respectivement, et qui présentent de fortes homologies de séquence. L'expression de EXTL2 et EXTL3 est ubiquitaire tandis que celle de EXTL1 est plus limitée puisque l'enzyme n'est retrouvée que dans les muscles squelettiques, le cerveau et la peau chez l'Homme (Busse-Wicher *et al.*, 2014). Elles possèdent toutes les trois une activité *N*-acétylglucosaminyl-transférase *in vitro*. Cependant, EXTL2 possède en plus une activité *N*-acétylgalactosaminyl-transférase. Elle semble d'ailleurs plus efficace pour transférer un résidu de GalNAc que pour transférer un résidu de GlcNAc (Kitagawa *et al.*, 1999). EXTL2 est la seule enzyme de la famille EXTL dont la structure tridimensionnelle a été résolue. Elle catalyse le transfert de monosaccharides sur la chaîne naissante avec rétention de la configuration du glycoside donneur. En raison des homologies de séquence observées entre les cinq membres composant les familles EXT et EXTL, il a été suggéré que ces cinq enzymes agiraient de la même manière (Pedersen *et al.*, 2003).

Le rôle des trois membres de la famille EXTL n'est pas encore élucidé. Même si, parmi les trois enzymes de la famille EXTL, c'est EXTL1 qui présente la plus grande identité de séquence avec EXT1, sa fonction est controversée. Tandis que certaines études suggèrent qu'elle pourrait participer à l'élongation des chaînes HS (activité GalNAc-TII) (Kim *et al.*, 2001 ; Busse *et al.*, 2007), il a été suggéré qu'elle n'était pas indispensable à la biosynthèse des HS puisque ses orthologues sont absents d'organismes inférieurs capables de synthétiser des HS tels que *C. elegans* ou *D. melanogaster* (Zak *et al.*, 2002).

L'intervention d'EXTL2 au cours de la biosynthèse des HS reste également sujet à controverse. Bien que l'enzyme ait tout d'abord été identifiée comme étant capable de

transférer un résidu de GalNAc sur l'amorce tétrasaccharidique, son produit n'a jamais été détecté dans des protéoglycanes naturels (Kitagawa *et al.*, 1995). Il n'a été observé que dans des oligosaccharides obtenus à partir de β -D-xylosides, qui jouent alors le rôle d'amorces artificielles (Salimath *et al.*, 1995). En fait, lorsqu'elle porte un résidu de GalNAc, l'amorce ne peut plus servir de substrat aux autres enzymes de biosynthèse des HS, ce qui peut expliquer pourquoi une telle amorce n'ait jamais été observée (Kitagawa *et al.*, 1999). De plus, il a récemment été montré que EXTL2 était capable de transférer un résidu de GlcNAc sur un tétrasaccharide dont le résidu de xylose est phosphorylé, mais le produit obtenu bloque la poursuite de la biosynthèse des HS puisqu'il n'est plus pris en charge par les autres enzymes (Nadanaka *et al.*, 2013). Finalement, l'invalidation de l'expression de EXTL2 conduit à une augmentation de la synthèse des HS chez des souris et à la production de chaînes plus longues dans les cellules HEK, sans modification des niveaux d'expression des autres enzymes de biosynthèse (Katta *et al.*, 2015). L'ensemble de ces données suggère donc que EXTL2 pourrait être impliquée dans la régulation de la biosynthèse des HS, d'une manière dépendante ou indépendante des modifications du tétrasaccharide de liaison, entraînant un arrêt précoce de la biosynthèse.

EXTL3 est capable d'exercer son activité *N*-acétylglucosaminyl-transférase aussi bien sur le tétrasaccharide de liaison (GlcNAc-TI) que sur la chaîne en cours de synthèse (GlcNAc-TII) (Kim *et al.*, 2001). Ses activités enzymatiques sont bien plus efficaces que celles de EXTL1 et de EXTL2. EXTL3 est donc l'enzyme favorite pour l'ajout du premier résidu de GlcNAc sur l'amorce tétrasaccharidique (Zak *et al.*, 2002). De manière surprenante, l'invalidation de l'expression de EXTL3 conduit à la synthèse de chaîne HS plus longues quand sa surexpression n'a pas d'effet sur la longueur des chaînes. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que lorsque l'expression de EXTL3 est diminuée, le nombre de tétrasaccharides de liaison liés à une GlcNAc, substrat nécessaire à la biosynthèse des HS, diminue également. Comme il y a moins d'accepteurs potentiels, la polymérisation des chaînes synthétisées est plus importante (Busse *et al.*, 2007 ; Busse-Wicher *et al.*, 2014). Enfin, des embryons de souris déficients en EXTL3 présentent un important défaut de synthèse des chaînes HS, renforçant alors l'idée selon laquelle cette enzyme jouerait un rôle clé au début de l'élongation des chaînes (Takahashi *et al.*, 2009). Des mutations dans les gènes codant l'enzyme orthologue chez *D. melanogaster* ou *C. elegans* conduisent également à une diminution de la biosynthèse des HS (Morio *et al.*, 2003 ; Bornemann *et al.*, 2004). Dans leur ensemble, ces résultats montrent que EXTL3 joue un rôle clé dans l'initiation de la biosynthèse des HS.

III. Maturation

A. Mécanisme général

La dernière étape de la biosynthèse des HS correspond à la maturation de la chaîne polysaccharidique. Il s'agit d'un processus particulièrement régulé impliquant une vingtaine d'enzymes qui agissent de manière séquentielle et coordonnée. On peut la diviser en cinq étapes : (i) une réaction de *N*-déacétylation suivie d'une réaction de *N*-sulfatation des résidus de GlcNAc, catalysées par les *N*-déacétylases/*N*-sulfotransférases (NDSTs), (ii) l'épimérisation des résidus de GlcUA réalisée par la C5-épimérase, (iii) la sulfatation en position C2 des acides uroniques grâce à l'action de l'héparane sulfate 2-*O*-sulfotransférase (HS2ST), (iv) la sulfatation en position C6 des résidus de GlcNAc, catalysée par les héparanes sulfates 6-*O*-sulfotransférases (HS6STs), (v) et la sulfatation en position C3 des résidus de GlcNAc, réalisée cette fois par les héparanes sulfates 3-*O*-sulfotransférases (HS3STs) (Figure 12). Quelle que soit la sulfotransférase intervenant, le groupement sulfate est toujours transféré à partir du même donneur, le PAPS, pour 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate. Enfin, lorsque les HS se trouvent à l'extérieur de la cellule, ils peuvent subir une dernière modification, une 6-*O*-désulfatation, catalysée par les 6-*O*-endosulfatases (Sulfs). C'est ce système de biosynthèse qui confère aux HS leur très large hétérogénéité structurale et qui leur permet d'interagir avec de nombreux ligands protéiques.

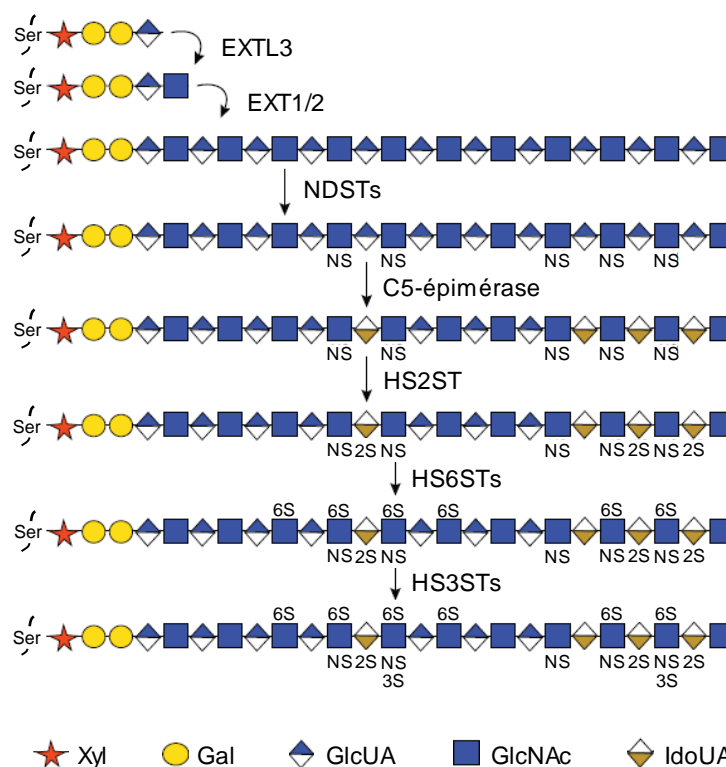


Figure 12 : La maturation des chaînes HS. Représentation schématique de la séquence de réactions enzymatiques. D'après Poulain & Yost, 2015.

B. La N-déacétylation/N-sulfatation

1. La famille des NDSTs

La N-déacétylation/N-sulfatation est la première étape de la maturation des HS. En raison du mode d'action séquentielle de l'ensemble des enzymes de modification, la N-déacétylation/N-sulfatation est indispensable au bon déroulement des modifications qui suivent. Elle a donc une influence certaine sur le degré de modification des chaînes HS et est à l'origine de l'organisation des différents domaines le long des chaînes HS.

Cette modification est réalisée par la famille des NDSTs qui est représentée par quatre isoenzymes chez les Vertébrés : NDST1, NDST2, NDST3 et NDST4, composées de 882, 883, 873 et 872 acides aminés respectivement. Elles sont codées par quatre gènes distincts mais dont l'organisation génomique est similaire. Les séquences protéiques présentent de fortes homologies entre elles, ce qui laisse supposer qu'elles ont un ancêtre commun et sont issues du même gène ancestral (Aikawa *et al.*, 2001 ; Grobe *et al.*, 2002). Elles possèdent toutes un domaine N-terminal cytoplasmique relativement court composé de 12 à 18 acides aminés, une région transmembranaire constituée d'une vingtaine d'acides aminés, une région tige longue de 40 acides aminés et un domaine globulaire C-terminal qui contient les activités catalytiques. Les NDSTs sont localisées au niveau du médian-Golgi et du réseau trans-golgien (Humphries *et al.*, 1997 ; Pinhal *et al.*, 2001). Comme une telle localisation est dictée par les domaines transmembranaires et tige des enzymes, les différences existantes entre les séquences protéiques dans ces régions suggèrent que la localisation des NDSTs pourrait légèrement varier selon l'isoforme (Nilsson & Warren, 1994).

Les NDSTs sont des enzymes bifonctionnelles. Dans un premier temps, elles enlèvent les groupements acétyles des résidus de GlcNAc avant d'y transférer un groupement sulfate (Grobe *et al.*, 2002). En effet, leur domaine globulaire, situé dans la lumière de l'appareil de Golgi, possède deux sites catalytiques distincts dont les fonctions sont complémentaires. Cette notion a été montrée par les travaux de Duncan *et al.* (2006). Les auteurs ont construit des formes tronquées qui ne possédaient pas l'intégralité du domaine globulaire. Ils ont observé que certaines formes tronquées menaient à la formation d'HS dont les résidus de GlcNAc n'étaient que déacétylés : elles ne contenaient donc que l'activité N-déacétylase. Cela étant, seul le domaine contenant l'activité N-sulfotransférase de la NDST1 a pu être cristallisé. Il a été montré qu'il pouvait accueillir un hexasaccharide et qu'il contenait deux sites nécessaires à la fixation du PAPS : le site 5'PSB (*5'-phosphosulfate binding motif*) et le site 3'PB (*3'-phosphate binding motif*) (Figure 13). Ces deux sites ont également été retrouvés dans plusieurs autres sulfotransférases (Kakuta *et al.*, 1998).

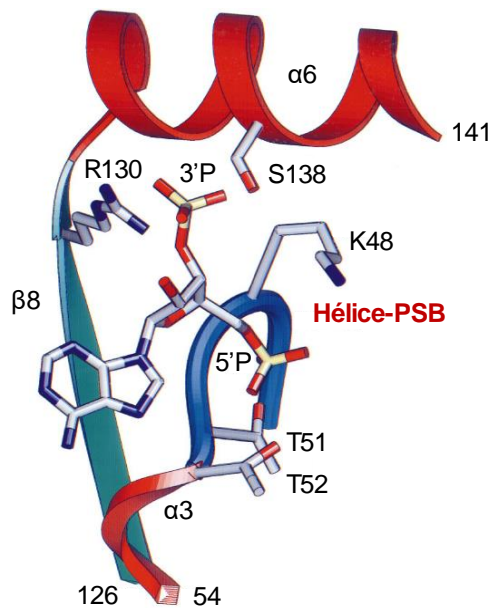


Figure 13 : Représentation schématique des sites nécessaires à la fixation du PAPS. Les hélices α sont en rouge, le brin β est en vert et la boucle PSB est en bleu. Les chaînes latérales d'acides aminés interagissant avec le PAPS sont aussi montrées. 3'P : groupement 3'-phosphate du PAPS. 5'P : groupement 5'-phosphate du PAPS. D'après Kakuta *et al.*, 1998.

Voilà plus de trente ans qu'il a été montré que l'activité des NDSTs était nécessaire à la maturation des chaînes HS (Bame *et al.*, 1994). En effet, des cellules CHO déficientes en NDST1 produisent des HS faiblement modifiés, présentant très peu de de *N*- et *O*-sulfates par rapport aux cellules contrôles. Cependant, comme il n'existe qu'une seule NDST chez des organismes inférieurs tels que *D. melanogaster* et *C. elegans*, l'existence de quatre isoenzymes chez les Vertébrés pose question (Grobe *et al.*, 2002). Des études de modélisation moléculaire *in silico* ont montré que les domaines catalytiques de chaque NDST présentaient des différences de forme et de charge. Ceci suggère qu'elles possèdent des spécificités de substrat différentes (Aikawa *et al.*, 2001). En ce sens, il a été observé que des cellules HEK293 surexprimant les NDST1 ou 2 produisaient des HS ayant différents profils de *N*-sulfatation. Les HS produits par les cellules surexprimant NDST2 présentaient plus de *N*-sulfates et des domaines NS plus longs. Cependant, le degré de sulfatation global des HS était augmenté dans les deux cas (Cheung *et al.*, 1996 ; Pikas *et al.*, 2000). En outre, même si toutes les NDSTs sont capables d'exercer leurs deux activités catalytiques *in vitro*, il existe *in vivo* des différences dans le ratio des activités *N*-sulfotransférase et *N*-déacétylase. Il a en effet été montré que l'activité *N*-déacétylase de la NDST4 était assez faible tandis que son activité *N*-sulfotransférase était élevée. Dans le cas de la NDST3, c'est l'inverse (Aikawa *et al.*, 2001). Dans leur ensemble, ces données suggèrent que les activités des différentes NDSTs ne sont pas redondantes. L'expression de l'une ou l'autre de ces isoenzymes pourrait contribuer à déterminer le profil de sulfatation des HS.

2. Régulations et variations de l'expression des NDSTs

Tandis que l'expression des NDST1 et 2 est ubiquitaire chez l'embryon et chez l'adulte, celle des NDST3 et 4 est limitée puisque ces enzymes sont essentiellement embryonnaires. La NDST3 est aussi exprimée chez l'adulte dans le cerveau, les reins, le foie, le thymus, les testicules et la rate. Chez l'adulte, la NDST4 n'est retrouvée que dans le cerveau (Aikawa *et al.*, 2001 ; Yabe *et al.*, 2005).

Plusieurs points restent à éclaircir quant à la régulation de l'expression des NDSTs. L'expression d'une isoenzyme ne semble pas avoir d'impact sur celle des autres, confirmant l'hypothèse selon laquelle leurs fonctions ne sont pas redondantes. En effet, la déficience en NDST1 ou NDST2 chez des souris n'a pas d'effet sur les niveaux d'ARNm codant les autres isoenzymes (Grobe *et al.*, 2002). Seule l'expression de la NDST2 a été décrite dans les mastocytes comme étant régulée au niveau transcriptionnel par un facteur de transcription, le GABP (*GA binding protein*) (Morii *et al.*, 2001). En revanche, l'expression des quatre NDSTs peut être régulée au niveau traductionnel. Les ARNm résultant de la transcription des gènes codant les NDSTs possèdent des séquences 5'-UTR (*5'-Untranslated Region*) inhabituellement longues (de 250 à 750 nucléotides), donnant à penser qu'il existe un mécanisme de régulation. En effet, ces régions contiennent des sites IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), lesquels permettent d'initier la traduction de manière indépendante de la coiffe du messager (Grobe *et al.*, 2002). Il a en outre été montré que l'expression de la NDST1 était régulée par les micro-ARN miR-24 et miR-191 (Ibrahim *et al.*, 2014).

D'autre part, l'expression des NDSTs pourrait être influencée par celle d'autres enzymes de biosynthèse des HS. En ce sens, il a été montré que l'expression de la NDST1 était influencée par celles de EXT1 et de EXT2, impactant ainsi le taux de sulfatation des chaînes HS. La surexpression de EXT2 en cellules HEK293 est associée à une augmentation de l'expression de la NDST1, ce qui augmente la sulfatation des HS. A l'inverse, la présence de EXT1 entraîne une diminution de l'expression de la NDST1 et donc une diminution de la sulfatation des HS. En fait, la NDST1 interagit avec EXT2. Il a donc été suggéré que la NDST1 pourrait entrer en compétition avec EXT1 pour la formation d'un complexe hétérodimérique (Presto *et al.*, 2008).

Bien que les mécanismes de régulation ne soient pas encore clairement établis, il a été montré que différents stimuli inflammatoires pouvaient influencer les niveaux d'expression des NDSTs. Par exemple, une stimulation au TNF- α ou à l'IFN- γ entraîne une diminution transitoire de l'expression des NDST1 et 2 (Carter *et al.*, 2003). Une stimulation au LPS entraîne une diminution de l'expression des NDST2 et 3 mais une augmentation de l'expression de la NDST1 (Krenn *et al.*, 2008). Enfin, le TNF- α entraîne une diminution de l'expression de la NDST3, alors que le TGF- β a le même effet sur les NDST1, 2 et 3 (Properzi *et al.*, 2008). Il n'est

cependant pas possible de conclure quant à une tendance à partir de ces données, les variations d'expression dépendant à la fois du stimulus et de l'isoenzyme concernée. L'expression des NDSTs peut également être sujette à des variations au cours de la polarisation des macrophages. Par rapport aux macrophages non activés, les niveaux de NDST1 et 2 sont augmentés dans les macrophages M1 mais ils ne varient pas dans les macrophages M2. Les NDST3 et 4 ne sont jamais détectables dans les macrophages, qu'ils soient non activés ou polarisés (Martinez *et al.*, 2015). Finalement, l'expression des NDSTs peut aussi varier en fonction du contexte pathologique, lors de diabète ou de cancer. Par exemple, une lésion vasculaire chez des souris entraîne une augmentation importante, d'un facteur 20 à 40, de l'expression de la NDST1 dans les cellules proches du vaisseau atteint, et, dans une moindre mesure, de la NDST2 (Adhikari *et al.*, 2008).

3. Différences fonctionnelles

Des expériences d'inactivation génique ont été menées chez des souris afin de mieux définir le rôle de chaque NDST. La déficience en NDST1 conduit à une diminution critique du taux de sulfatation des chaînes HS, ce qui est associé à une mortalité importante des nouveau-nés à cause de troubles respiratoires (Fan *et al.*, 2000 ; Ringvall *et al.*, 2000). En revanche, l'absence d'expression de la NDST2 n'entraîne pas de létalité précoce. Les souris sont viables, fertiles et présentent des chaînes HS sulfatées normalement. La déficience en NDST2 cause toutefois quelques anomalies. Ces souris présentent en effet un déficit important en mastocytes dont les granules sont anormaux et ne contiennent pas de chaînes d'héparine (Ledin *et al.*, 2004 ; Ringvall & Kjellén, 2010). De plus, les souris doublement déficientes NDST1^{-/-} et NDST2^{-/-} décèdent au stade embryonnaire (Grobe *et al.*, 2002). Ces données suggèrent donc qu'il existe des différences fines dans les fonctions remplies par ces deux enzymes : la NDST1 serait requise pour l'initiation de la *N*-sulfatation tandis que la NDST2 serait plutôt impliquée dans l'extension des zones *N*-sulfatées.

Des expériences similaires ont été menées dans le cas de la NDST3. Les souris qui ne l'expriment pas sont tout à fait viables et sans dysfonctionnement aucun, avec des HS dont le taux de sulfatation est cependant légèrement diminué. L'absence de la NDST3 pourrait donc être compensée par la présence des autres NDSTs (Pallerla *et al.*, 2008). Étonnamment, des cellules exprimant la NDST3, mais pas les NDST1 et 2, présentent des chaînes HS dénuées de groupements sulfates, mais avec le même taux de GlcNH₂ que les cellules normales (Holmborn *et al.*, 2004). Il a donc été suggéré que la NDST3 était essentiellement impliquée dans la *N*-déacétylation, et peu impliquée dans la *N*-sulfatation.

Très peu de données sont disponibles quant à l'inactivation de la NDST4 en modèle murin. Une étude a montré que des souris NDST4^{-/-} étaient viables et fertiles, et que leur durée de vie était semblable à celle des souris normales. Elles ne montrent aucun déséquilibre

comportemental ou histologique majeur, excepté au niveau du côlon. En effet, il a été observé une apoptose anormalement importante au niveau de l'épithélium colique, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules caliciformes associée à une diminution du nombre de colonocytes (Jao *et al.*, 2016). Il est ainsi probable que la NDST4 soit au moins impliquée dans la synthèse de chaînes HS spécifiques nécessaires à l'homéostasie du côlon.

C. L'épimérisation des acides uroniques

Une fois que les chaînes ont subi l'action des NDSTs, elles peuvent être soumises à une épimérisation des acides D-glucuroniques en acides L-iduroniques. Il s'agit de la deuxième étape de maturation des HS, catalysée par la glucuronyl C5-épimérase. A la différence de nombreuses épimérases qui ne peuvent modifier que des monosaccharides, cette enzyme a la capacité d'agir sur le polysaccharide en cours de synthèse (Valla *et al.*, 2001). Une seule C5-épimérase codée par un unique gène, nommé *Glce*, a été identifiée chez les Vertébrés. C'est une enzyme transmembranaire de type II, composée de 617 acides aminés et qui a une masse moléculaire de 60 kDa. Elle possède un domaine N-terminal cytoplasmique, un domaine transmembranaire, un domaine tige et un domaine globulaire qui est situé dans la lumière de l'appareil de Golgi et qui contient l'activité catalytique. La C5-épimérase est très conservée entre les espèces puisque les séquences protéiques des formes humaine, bovine et murine présentent 97% d'homologie (Li, 2010). La résolution de la structure cristalline de l'enzyme a montré qu'elle était présente sous la forme d'homodimères, lesquels existent grâce à l'établissement de liaisons hydrophobes entre les deux régions N-terminales mais aussi entre les régions C-terminales (Figure 14). Le domaine d'interaction avec le substrat étant situé dans la partie C-terminale, il est fortement probable que la formation du dimère soit nécessaire à la reconnaissance de la chaîne en cours de synthèse (Qin *et al.*, 2015).

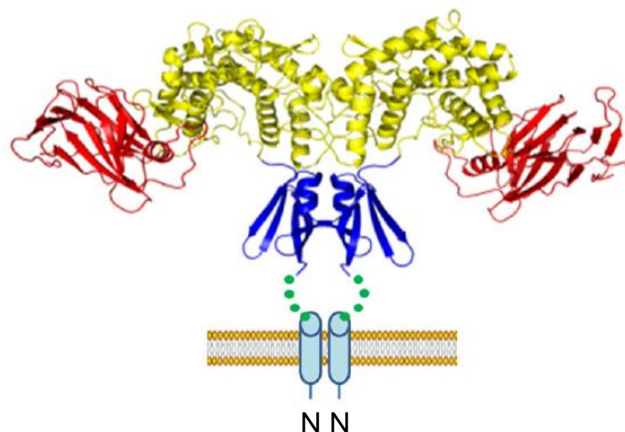


Figure 14 : Organisation en homodimère de la C5-épimérase.
D'après Qin *et al.*, 2015.

La C5-épimérase agit essentiellement sur les résidus de GlcUA situés au niveau de l'extrémité réductrice des résidus de GlcNS. La présence d'un deuxième résidu de GlcNS à

l'extrémité non réductrice augmente sa vitesse de réaction. Elle n'agit que très peu sur les GlcUA reliés à des GlcNAc. C'est la raison pour laquelle la proportion de résidus de IdoUA contenus dans les domaines NS et NA/NS est très importante, alors qu'elle est faible dans les domaines NA. De plus, il a été montré que l'activité C5-épimérase était inhibée par un taux important de *O*-sulfatation. La C5-épimérase doit donc agir après les NDSTs, mais avant les différentes sulfotransférases modifiant les chaînes HS (Hagner-McWhirter *et al.*, 2000). D'autre part, plusieurs études montrent que la C5-épimérase pourrait être associée à HS2ST. En effet, lorsqu'une séquence de rétention dans le RE est greffée à la C5-épimérase, la localisation subcellulaire de HS2ST est également modifiée puisque cette dernière est partiellement retrouvée dans le RE. La formation d'un tel complexe a un effet sur l'activité des deux enzymes et est nécessaire à la modification des chaînes HS (Pinhal *et al.*, 2001 ; Préchoux *et al.*, 2015). Pour agir, la C5-épimérase procède à une élimination/addition d'un proton situé en position C5 de l'acide hexuronique, en passant par la formation d'un carbanion, sans pour autant rompre la liaison osidique (Valla *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été montré que son activité était réversible *in vitro*, bien qu'elle semble irréversible *in vivo* (Hagner-McWhirter *et al.*, 2004).

L'expression de la C5-épimérase est ubiquitaire, aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte. Elle peut varier en fonction du contexte comme dans le cas de cancers (voir Partie 4). Son expression est régulée au niveau transcriptionnel, notamment par le complexe β -caténine/TCF-4 qui se fixe sur le promoteur du gène après un remodelage de la chromatine (Ghiselli & Agrawal, 2005 ; Mostovich *et al.*, 2012). Il existe également un niveau de régulation d'expression post-transcriptionnel grâce à l'intervention du microARN miR-218, qui inhibe la traduction sans entraîner la dégradation de l'ARNm. Une telle régulation a été observée chez des cellules de cancer du sein mais aussi chez celles de la rétine, où ce mécanisme est impliqué dans la mise en place des vaisseaux sanguins (Small *et al.*, 2010 ; Prudnikova *et al.*, 2012).

Des souris déficientes en C5-épimérase présentent des malformations au niveau des reins, des poumons et du squelette. Elles ne sont pas viables après la naissance. L'analyse structurale des HS a montré que cette déficience était associée à une absence totale de résidus de IdoUA et une diminution importante du taux de *O*-sulfatation (Li *et al.*, 2003 ; Ledin *et al.*, 2004). De même, l'héparine produite par des mastocytes n'exprimant pas la C5-épimérase ne contient aucun résidu de IdoUA et présente une *O*-sulfatation altérée (Feyerabend *et al.*, 2006). Ces études mettent donc en lumière l'importance de l'épimérisation dans la maturation des HS, mais aussi le rôle critique de la C5-épimérase pour l'établissement de leurs propriétés. Par ailleurs, la déficience en C5-épimérase a été associée à une augmentation du taux de différenciation des chondrocytes et de leur prolifération (Dierker *et al.*, 2016). Cette enzyme pourrait aussi impacter la physiologie d'autres types cellulaires. En ce sens, il a été montré que

l'invalidation de la C5-épimérase entraîne une diminution de la prolifération des cellules souches neuronales mais favorise leur différenciation (Li *et al.*, 2014).

D. La 2-O-sulfatation

Après l'étape de C5-épimérisation, un groupement sulfate est transféré en position C2 des acides uroniques grâce à l'action de la HS2ST. Cette enzyme est une protéine transmembranaire de type II composée de 356 acides aminés, codée par un unique gène nommé *Hs2st1* et localisée dans l'appareil de Golgi (Kobayashi *et al.*, 1997). Elle peut exister sous la forme d'un homotrimère, les domaines transmembranaires interagissant entre eux (Figure 15). Toutefois, les domaines catalytiques agissent de manière indépendante (Bethea *et al.*, 2008). Elle est également associée à la C5-épimérase *in vivo* (Pinhal *et al.*, 2001). Même si un manque de données ne permet pas de l'affirmer, il est probable que ces enzymes forment un complexe macromoléculaire composé d'un monomère de C5-épimérase en interaction avec un homotrimère de HS2STs.

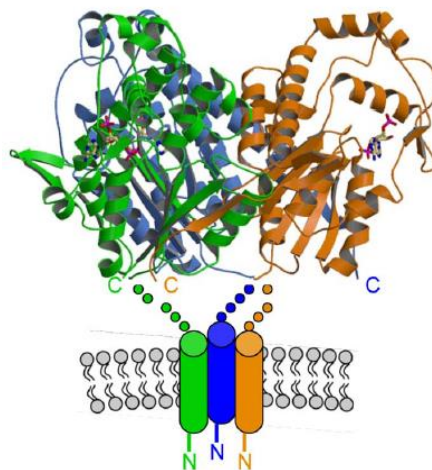


Figure 15 : Organisation de HS2ST en homotrimère. Les monomères sont représentés en vert, en bleu et en orange. D'après Bethea *et al.*, 2008.

Plusieurs études ont porté sur l'identification du ou des substrats de la HS2ST. Il a été montré que la surexpression de l'enzyme conduisait à une augmentation de la proportion de GlcUA2S associée à une diminution du nombre de IdoUA, sans pour autant changer le taux de 2-O-sulfatation globale (Rong *et al.*, 2000). D'autre part, l'activité du complexe formé par l'association de la C5-épimérase avec la HS2ST sur une chaîne composée uniquement de résidus GlcUA et IdoUA dans des proportions 80/20 mène à la formation de résidus de IdoUA2S en majorité, mais également à la formation de résidus GlcUA2S (Smeds *et al.*, 2010). Ces données montrent que même si les résidus de IdoUA sont les substrats préférentiels de la HS2ST, l'enzyme peut aussi modifier les résidus de GlcUA. Comme dans le cas de la C5-épimérase, l'action de la HS2ST est favorisée sur les résidus d'acides uroniques situés à l'extrémité réductrice des GlcNS. Les résidus de IdoUA2S se situent donc dans les zones NS et

NA/NS (Merry *et al.*, 1999). La présence de groupements 6-*O*-sulfates inhibe son activité. À l'inverse, la surexpression de la HS2ST en cellules HEK293 conduit à une augmentation de l'activité *O*-sulfotransférase d'un facteur 6. Elle agit donc avant les autres *O*-sulfotransférases, comme la C5-épimérase (Rong *et al.*, 2000, 2001 ; Thieker *et al.*, 2018). Par ailleurs, son affinité est plus importante lorsque le substrat est déjà sulfaté, suggérant qu'elle est une enzyme processive (Smeds *et al.*, 2010).

Même si l'expression de la HS2ST est ubiquitaire chez l'adulte, il existe d'importantes variations dans les niveaux d'expression en fonction du type cellulaire. En effet, des niveaux élevés de HS2ST sont retrouvés dans les poumons ou le cerveau tandis qu'elle est à peine détectable dans la rate (Rong *et al.*, 2001). Son expression est aussi influencée par le contexte physiopathologique. Ainsi, un dysfonctionnement vasculaire entraîne une augmentation modérée de son expression (Adhikari *et al.*, 2008). Par contre, une réaction inflammatoire conduit à une forte augmentation de son expression en association avec une augmentation du taux de 2-*O*-sulfatation (Properzi *et al.*, 2008), et son niveau d'expression est important dans les macrophages M2 mais plus faible dans les macrophages M1 (Martinez *et al.*, 2015). Elle peut aussi être modifiée lors des cancers (voir Partie 4). Enfin, la déficience en HS2ST a des conséquences dramatiques sur les souris. Ces dernières présentent des malformations des reins, des yeux et du squelette qui entraînent leur mort durant la période néo-natale (Bullock *et al.*, 1998).

E. La 6-*O*-sulfatation

La 6-*O*-sulfatation est catalysée par les enzymes de la famille des HS6STs qui est composée de trois membres chez les Vertébrés : HS6ST1, HS6ST2 et HS6ST3. Ces trois enzymes, composées de 411, 645 et 471 acides aminés respectivement, sont codées par trois gènes distincts (Habuchi *et al.*, 1995, 2000). En outre, une quatrième forme nommée HS6ST2S a été identifiée chez l'Homme et chez la Souris. Elle résulte de l'épissage alternatif du transcrit obtenu à partir du gène codant HS6ST2. Cette forme est dépourvue des 40 acides aminés qui composent la région tige de HS6ST2 (Habuchi *et al.*, 2003). Les trois HS6STs sont moins conservées entre elles que les autres familles d'enzyme de modification des HS. En effet, HS6ST1 présente 51% et 53% d'homologie avec HS6ST2 et HS6ST3, et HS6ST2 partage 50% d'homologie avec HS6ST3. Cependant, les domaines de fixation au PAPS sont très similaires. Comme les autres enzymes de biosynthèse des HS, ce sont des protéines transmembranaires de type II qui se trouvent dans l'appareil de Golgi et plus particulièrement au niveau du réseau trans-golgien. Il a été observé que la région tige de ces enzymes était nécessaire à leur localisation golgienne, mais aussi à leur oligomérisation et à leur activité (Nagai *et al.*, 2004). De manière surprenante, elles ont été purifiées à partir de surnageant de culture de cellules CHO. Elles peuvent donc également être sécrétées dans le milieu extracellulaire (Habuchi *et*

al., 1995). Il a été montré que la sécrétion de HS6ST3, et non de HS6ST1 ou 2, était réalisée selon un mécanisme dépendant d'une β -sécrétase. Les variations de concentration intracellulaire en HS6ST3 pourraient d'ailleurs constituer un mécanisme de régulation du taux de 6-*O*-sulfatation. En effet, la rétention de HS6ST3 dans l'appareil de Golgi suite à l'inhibition de l'activité β -sécrétase conduit à une augmentation du taux de 6-*O*-sulfatation (Nagai *et al.*, 2007).

La spécificité de substrat des HS6STs est moins stricte que celle de la HS2ST. Même si les groupements 6-*O*-sulfates sont plus souvent localisés dans les zones NS, non loin des résidus de IdoUA2S, ils peuvent aussi être retrouvés dans les domaines NA/NS et même dans les domaines NA (Maccarana *et al.*, 1996). En effet, les HS6STs peuvent transférer un groupement 6-*O*-sulfate aussi bien sur des résidus de GlcNAc que sur des résidus GlcNS situés à l'extrémité réductrice des résidus de GlcUA ou IdoUA, que ces derniers soient 2-*O*-sulfatés ou non, avec toutefois une préférence pour les disaccharides dont l'acide uronique est un résidu de IdoUA (Zhang *et al.*, 2001 ; Smeds *et al.*, 2003). Il a toutefois été montré que ces trois isoenzymes présentaient des différences fines de spécificité et d'affinité. Alors que HS6ST1 a une plus grande affinité pour le disaccharide IdoUA-GlcNS, HS6ST2 agit sur les unités disaccharidiques GlcUA-GlcNS lorsque ces dernières sont nombreuses. L'activité de HS6ST2 dépend donc de la concentration en substrat (Habuchi, 2000). HS6ST3 reconnaît les deux types de disaccharide et son activité ne dépend pas de leur concentration. Toutefois, elle a plus d'affinité pour les disaccharides 2-*O*-sulfatés (Jemth *et al.*, 2003).

Chez l'embryon, l'expression des HS6STs est très variable et dépend du stade de développement mais aussi du type cellulaire (Cadwallader & Yost, 2006a). Par exemple, des études en modèle murin ont montré que HS6ST1 était retrouvée dans les tissus nerveux et épithéliaux au cours du développement quand HS6ST2 était exprimée dans les tissus mésenchymateux. Le transcrit codant HS6ST3 apparaît à un stade plus tardif du développement et sa distribution est plus restreinte (Sedita *et al.*, 2004). Chez l'adulte, l'expression des différentes HS6STs dépend du type cellulaire. HS6ST1 et HS6ST2 sont essentiellement exprimées dans le foie et dans le cerveau, respectivement, tandis que HS6ST3 est exprimée de manière ubiquitaire mais à des niveaux plus faibles. La forme HS6ST2S est retrouvée au niveau du placenta, des ovaires, et des reins du fœtus (Habuchi *et al.*, 2000, 2003). Ces variations d'expression suggèrent que les HS6STs exercent des fonctions qui ne seraient pas redondantes. En outre, l'expression de ces enzymes peut être influencée par le contexte pathologique. Par exemple, il a été montré que les niveaux d'expression des HS6ST1 et 2 augmentaient respectivement dans les fibroblastes et les cellules épithéliales au cours d'une fibrose pulmonaire (Lu *et al.*, 2014). L'expression des HS6STs varie également au cours de cancers (voir Partie 4).

L'expression des HS6STs est critique pour le développement embryonnaire. En effet, la déficience en HS6ST1 chez des souris entraîne des malformations des poumons et un défaut de vascularisation du placenta, autant de dysfonctionnements qui conduisent le plus souvent à la mort au stade embryonnaire. Les souris arrivant à terme présentent un retard de croissance important qui entraîne un décès périnatal rapide. L'analyse structurale des HS produits par ces souris déficientes montre une diminution importante du nombre de résidus GlcNS6S et GlcNAc6S, suggérant que HS6ST1 est impliquée dans leur synthèse *in vivo* (Habuchi *et al.*, 2007). A l'inverse, la déficience en HS6ST2 n'entraîne pas de létalité et les souris ne présentent pas d'anomalies majeures (Sugaya *et al.*, 2008). La double déficience HS6ST1^{-/-} et HS6ST2^{-/-} entraîne une mort plus précoce que la simple déficience en HS6ST1. Les HS produits par ces souris montrent un défaut de 6-*O*-sulfatation corrélé à une augmentation du nombre de motifs 2-*O*-sulfatés. (Sugaya *et al.*, 2008 ; Habuchi *et al.*, 2010). Ces études suggèrent que les fonctions remplies par ces deux enzymes ne sont pas redondantes : HS6ST1 et HS6ST2 pourraient exercer des rôles complémentaires. Par ailleurs, les effets de la déficience en HS6ST1 ou 2 peuvent être expliqués par le fait que la 6-*O*-sulfatation est indispensable à l'interaction avec différents morphogènes et facteurs de croissance. La signalisation associée à ces molécules est donc fortement diminuée chez les souris n'exprimant pas les HS6STs (Habuchi *et al.*, 2010 ; Ferreras *et al.*, 2012).

F. La 3-*O*-sulfatation

1. La famille de HS3STs

Dans le schéma général de la biosynthèse des HS, la dernière étape de modification est la 3-*O*-sulfatation et elle est catalysée par les HS3STs. La famille des HS3STs est la plus grande famille de sulfotransférases modifiant les HS. Elle contient sept isoenzymes chez les Mammifères : HS3ST1, 2, 3A, 3B, 4, 5 et 6 (Tableau 3). Par ailleurs, il existe une isoenzyme supplémentaire, nommée HS3ST7, chez le poisson zèbre. Leur partie N-terminale est assez variable en termes de taille et de séquence, ce qui pourrait contrôler leur localisation subcellulaire et/ou leur activité. Leur partie C-terminale contient le domaine sulfotransférase (Shworak *et al.*, 1999 ; Kusche-Gullberg & Kjellén, 2003). Comme les autres enzymes de modification des HS, les HS3STs sont des enzymes transmembranaires de type II, à l'exception de la HS3ST1 qui reste dans la lumière de l'appareil de Golgi malgré l'absence d'ancrage dans la membrane (Shworak *et al.*, 1997, 1999). Les HS3STs peuvent également exister sous forme de complexe oligomériques. Par exemple, une étude *in vitro* a montré que si HS3ST3A présentait la même affinité pour les chaînes HS que pour les chaînes CS, seules les chaînes HS induisent son oligomérisation et donc son activité (Wille *et al.*, 2007).

Tableau 3 : Caractéristiques des HS3STs humaines

	Nombre d'acides aminés total	Nombre d'acides aminés composant les domaines			
		Cytoplasmique	Transmembranaire	Tige	Sulfotransférase
HS3ST1	307	/	/		237
HS3ST2	367	19	21	75	237
HS2ST3A	406	24	18	108	237
HS3ST3B	390	33	20	84	237
HS3ST4	456	35	24	138	237
HS3ST5	346	13	19	58	240
HS3ST6	342	32	17	42	235

L'alignement des séquences protéiques des HS3STs a montré qu'elles partageaient 60% d'homologie dans leur domaine sulfotransférase. Elles ont d'ailleurs été divisées en deux groupes sur la base de ces homologies (Liu & Pedersen, 2007). Le premier groupe rassemble les HS3ST1 et 5, qui catalysent la formation du motif de fixation de l'AT-III (GlcNAc/NS6S-GlcUA-GlcNS_{3S±6S}-IdoUA2S-GlcNS6S) et sont regroupées sous la dénomination « HS3STs de type AT ». Elles partagent 71% d'homologie dans leur domaine sulfotransférase (Xia *et al.*, 2002). Le deuxième groupe est composé des HS3ST2, 3A, 3B, 4 et 6, qui sont impliquées dans la génération du motif de fixation de la protéine gD du virus HSV-1 (IdoUA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNAc-UA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNH₂_{3S6S}). Ces dernières sont donc regroupées sous la dénomination « HS3STs de type gD ». Leur domaine sulfotransférase est très conservé puisqu'elles partagent plus de 80% d'homologie dans cette région (Shukla *et al.*, 1999 ; Tiwari *et al.*, 2005 ; Xu *et al.*, 2005 ; O'Donnell *et al.*, 2006 ; Lawrence *et al.*, 2007).

2. Spécificités de substrat

Les deux groupes de HS3STs génèrent des motifs 3-*O*-sulfatés particuliers. Ainsi, HS3ST1 reconnaît préférentiellement des motifs présentant un résidu de GlcUA au niveau de l'extrémité non réductrice d'un résidu de GlcNS±6S. Elles peuvent tout de même agir si l'acide uronique est un résidu de IdoUA mais il ne faut pas qu'il soit 2-*O*-sulfaté. Les HS3STs de type gD agissent principalement sur des motifs composés d'un résidu de GlcNS±6S ou de GlcNH₂±6S si l'acide uronique du côté non réducteur est un résidu de IdoUA ou GlcUA, mais la 2-*O*-sulfatation ne bloque pas leur activité. *In vitro*, HS3ST5 est capable de générer les deux types de motifs malgré son appartenance au sous-groupe des HS3STs de type AT (Figure 16A). Au niveau du site catalytique, les HS3STs de type gD contiennent un résidu de lysine conservé qui leur permet d'interagir avec la charge négative des groupements 2-*O*-sulfates et donc de limiter les répulsions électrostatiques (Liu *et al.*, 1999 ; Wu *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2005 ; Mochizuki *et al.*, 2008 ; Thacker *et al.*, 2014). A la place de ce résidu de lysine, HS3ST1 contient un

résidu d'asparagine neutre, ce qui pourrait expliquer pourquoi cette enzyme ne peut pas modifier des motifs 2-*O*-sulfatés (Zhang *et al.*, 1999, 2001).

Même si la 3-*O*-sulfatation est généralement considérée comme étant la dernière étape de maturation des HS, des travaux récents suggèrent que le moment d'action des HS3STs pourrait dépendre des spécificités de substrat de chaque isoenzyme. Dans leur étude réalisée *in vitro*, Wang *et al.* (2017) ont montré que HS3ST1 modifiait préférentiellement des disaccharides 6-*O*-sulfatés, soutenant alors la vision classique de la biosynthèse des HS dans laquelle la 3-*O*-sulfatation est postérieure à la 6-*O*-sulfatation. Ces résultats indiquent par ailleurs que HS3ST1 reconnaît un substrat qui porte un groupement 6-*O*-sulfate. Toutefois, les auteurs ont également observé que l'action de HS3ST3 était favorisée lorsque les disaccharides étaient dénués de groupement 6-*O*-sulfate. Pourtant, le disaccharide IdoUA2S-GlcNS3S6S est l'un des produits majeurs des HS3STs (Mochizuki *et al.*, 2008). Ainsi, ces résultats donnent à penser que HS3ST3 agirait majoritairement avant les HS6STs pour la synthèse de ce motif. Il pourrait alors exister différentes voies pour aboutir à la synthèse des différents motifs 3-*O*-sulfatés.

La résolution des structures cristallines des HS3ST1, 3A et 5 a montré que leurs sites catalytiques respectifs présentaient des formes différentes dans l'espace (Edavettal *et al.*, 2004 ; Moon *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2008 ; Moon *et al.*, 2012). Deux acides aminés présents dans la HS3ST1, H²⁷¹ et E⁸⁸, induisent une ouverture étroite du site. Les résidus correspondants ont été déterminés chez les HS3ST3A et HS3ST5 : il s'agit respectivement de G¹⁸² et G³⁶⁵, et de S¹²⁰ et A³⁰⁶. Ces résidus sont moins volumineux et forment donc une ouverture plus large (Figure 16B). Des expériences de mutagenèse dirigée échangeant ces résidus d'acides aminés suffisent à conférer à une enzyme la spécificité de substrat de l'autre. Par ailleurs, même si *in vitro*, seuls des disaccharides ont été identifiés clairement comme étant les substrats des HS3STs, ces dernières études suggèrent qu'elles reconnaissent au moins un pentasaccharide. Il est toutefois envisageable qu'elles reconnaissent *in vivo* un oligosaccharide plus grand, ajoutant alors un degré de complexité dans les interactions HS3ST/substrat (Thacker *et al.*, 2014). Chaque HS3ST pourrait donc posséder des spécificités de substrat tout à fait particulières, expliquant par là-même l'existence des sept isoenzymes.

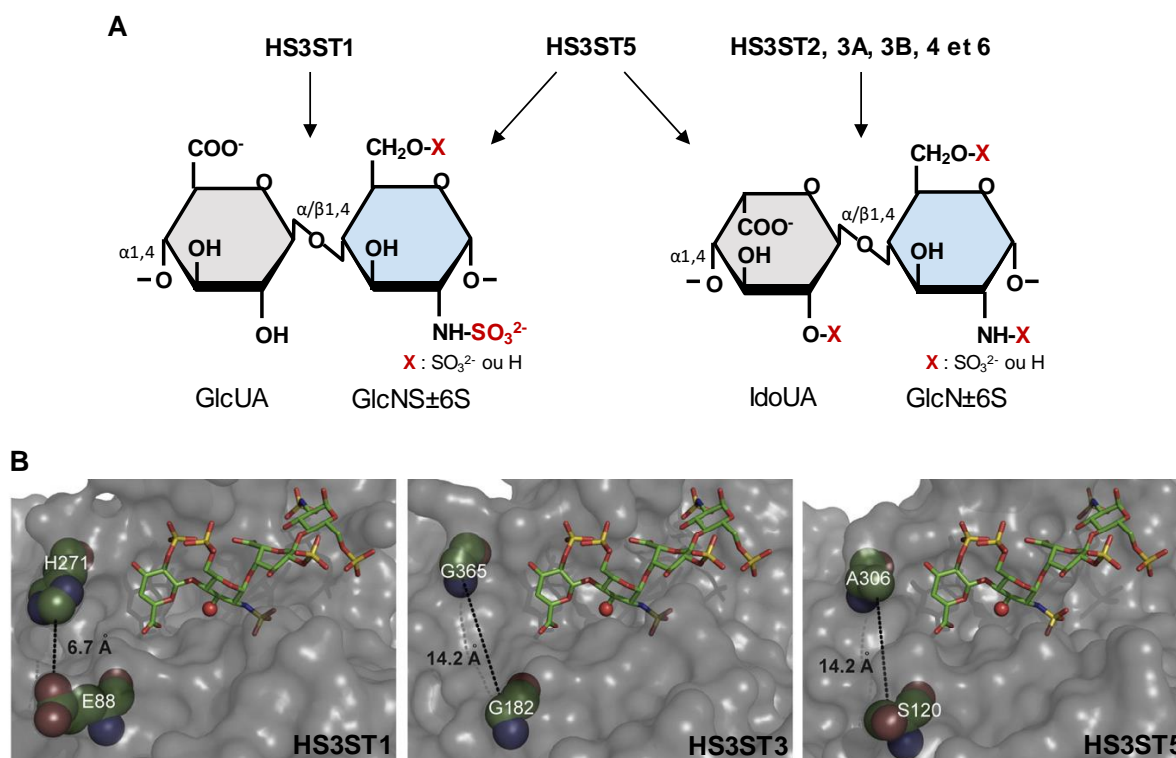


Figure 16 : Spécificité de substrat des HS3STs. (A) Substrats modifiés *in vitro* par chaque type de HS3ST. D'après Liu & Pedersen, 2007. (B) Représentation des chaînes HS en interaction avec les HS3ST1, 3 et 5. D'après Thacker *et al.*, 2014.

3. HS3STs et NDSTs : similarités et différences structurales

Les structures tertiaires des domaines sulfotransférases des HS3STs sont très similaires à celles des domaines sulfotransférases des NDSTs, les séquences protéiques de ces enzymes partageant par ailleurs environ 30% de similarité et jusque 50% de similarité dans leur domaine sulfotransférase (Edavettal *et al.*, 2004). Etant donné que les HS3STs, comme toutes les sulfotransférases, utilisent le PAPS en tant que donneur de sulfate, il n'est pas étonnant d'observer des ressemblances au niveau de leur site catalytique. Les domaines sulfotransférases des NDST1 et HS3ST3A adoptent en effet un repliement sphérique, présentant un grand sillon dédié à l'interaction avec la chaîne HS. Les deux sites de fixation au PAPS, 5'PSB et 3'PB sont retrouvés au centre des structures (Moon *et al.*, 2004).

Cependant, une différence importante de composition existe entre les sites de liaison aux HS dans les domaines catalytiques de ces deux familles d'enzymes, puisque celui des HS3STs contient significativement plus d'acides aminés basiques. Ces différences sont dues au fait que les substrats de ces deux enzymes diffèrent largement. Tandis que les NDSTs reconnaissent une chaîne HS neutre, les HS3STs agissent sur un polysaccharide très sulfaté (Edavettal *et al.*, 2004). La co-cristallisation de HS3ST3 en interaction avec du PAP et un tétrasaccharide a montré qu'un important réseau de liaisons hydrogènes était mis en place entre la chaîne saccharidique et les résidus K¹⁶¹, R¹⁶⁶, K²¹⁵, Q²⁵⁵, K³⁶⁸ et R³⁷⁰. Ces six résidus sont tous conservés dans la famille des HS3STs. De manière intéressante, il manque trois de

ces six acides aminés au sein des domaines sulfotransférases des NDSTs (K¹⁶¹, R¹⁶⁶ et Q²⁵⁵), ce qui suggère que ces résidus sont particulièrement importants dans la reconnaissance des substrats spécifiques des HS3STs. Cependant, comme ils sont retrouvés dans toutes les HS3STs, ils ne jouent pas de rôle dans la spécificité de substrat au sein de cette famille (Moon *et al.*, 2004).

4. Localisation subcellulaire et distribution tissulaire

Comme les autres enzymes intervenant dans la maturation des HS, il a longtemps été admis que les HS3STs étaient localisées dans l'appareil de Golgi. Cependant, une étude a récemment démontré que la localisation subcellulaire de certaines HS3STs pouvait être inattendue. En effet, si la localisation golgienne de HS3ST3B n'est pas surprenante, il a été observé que HS3ST2 se situait au niveau de la membrane plasmique et co-localisait partiellement avec le syndécan-2. De plus, lorsque l'enzyme est dépourvue de son domaine sulfotransférase ou que l'expression du syndécan-2 est invalidée, elle reste dans l'appareil de Golgi, suggérant que son domaine catalytique est nécessaire à sa localisation particulière proche du protéoglycane (Delos *et al.*, 2018).

L'expression des différentes HS3STs est variable et dépend largement du type cellulaire mais également du contexte physiopathologique (voir Partie 5). Globalement, les HS3ST1, 3A et 3B sont exprimées par de nombreux types cellulaires, alors que la distribution des HS3ST2, 4, 5 et 6 est beaucoup plus restreinte (Tableau 4). Ainsi, les HS3ST2 et 4 sont retrouvées essentiellement dans le cerveau, avec une expression finement dirigée (Shworak *et al.*, 1999 ; Caldwell & Yost, 2006b ; Lawrence *et al.*, 2007 ; Mochizuki *et al.*, 2008). En ce sens, il a été montré que les deux enzymes étaient fortement exprimées dans le ganglion trigéminal (Lawrence *et al.*, 2007). Une autre étude a montré que la HS3ST2 n'était exprimée que chez les neurones exprimant le TrkC (*Tropomyosine receptor kinase C*), présents dans le ganglion trigéminal et dans le ganglion de la racine dorsale (Hasegawa & Wang, 2008). La HS3ST5 est fortement exprimée dans les muscles squelettiques (Xia *et al.*, 2002). HS3ST6, quant à elle, a été retrouvée dans le foie et les reins de souris et, dans une moindre mesure, dans le cœur, le cerveau, les poumons et les testicules (Xu *et al.*, 2005) tandis qu'elle n'est exprimée qu'au stade embryonnaire chez le poisson zèbre (Caldwell & Yost, 2006b).

Tableau 4 : Expression tissulaire des HS3STs

HS3ST1	Cœur, cerveau, poumons, reins, rate, estomac, intestin grêle, côlon, testicules
HS3ST2	Cerveau
HS3ST3A	Cœur, placenta, poumons, foie, reins, rate, estomac, intestin grêle, côlon, testicules
HS3ST3B	Cœur, placenta, poumons, foie, reins, rate, estomac, côlon, testicules, pancréas, muscles squelettiques
HS3ST4	Cerveau
HS3ST5	Cerveau, muscles squelettiques
HS3ST6	Foie, reins

5. Prévalence de la 3-*O*-sulfatation

A l'origine, les groupements 3-*O*-sulfates ont été découverts grâce à l'identification d'une enzyme contenue dans l'urine et capable de retirer des groupements sulfates à partir de *N*-sulfoglucosamine-3-sulfate (Leder, 1980). De plus, Lindahl *et al.* ont montré en 1980 que l'héparine contenait des groupements 3-*O*-sulfates puisqu'elle était sensible à l'action de cette 3-*O*-sulfatase, maintenant connue sous le nom de arylsulfatase G. Par la suite, des analyses en RMN et en spectrométrie de masse ont confirmé ces résultats (Meyer *et al.*, 1981 ; Yamada *et al.*, 1993). Les groupements 3-*O*-sulfates ont également été retrouvés dans des HS extraits de divers tissus (Marcum *et al.*, 1986 ; Pejler *et al.*, 1987a ; Edge & Spiro, 1990). Selon ces premières études, la prévalence de la 3-*O*-sulfatation est assez variable et dépend largement de la source en HS. En effet, alors que moins de 1% des disaccharides portent un groupement 3-*O*-sulfate dans les HS extraits de cellules endothéliales (Marcum *et al.*, 1986), 6% et quasiment 10% des disaccharides composant les HS respectifs des fluides folliculaires et de la membrane de Reichert sont 3-*O*-sulfatés (Pejler *et al.*, 1987a ; de Agostini *et al.*, 2008). Le taux de 3-*O*-sulfatation de chaînes HS extraites de certains tissus animaux peut même être relativement important, comme chez l'espèce marine *Anomalocardia brasiliensis* dont 25 à 30% des unités disaccharidiques sont 3-*O*-sulfatées (Pejler *et al.*, 1987b). A l'opposé, certains tissus contiennent des chaînes HS dénuées de groupements 3-*O*-sulfates, comme c'est le cas de la membrane basale de sarcomes d'Engelbreth-Holm-Swarm murins (Pejler *et al.*, 1987a).

Bien que les HS3STs soient exprimées dans de nombreux tissus, peu de données sont disponibles quant à l'étude structurale des HS et leur taux de 3-*O*-sulfatation. En raison des difficultés à obtenir des standards 3-*O*-sulfatés en quantités suffisantes, mais également à cause des limitations technologiques, la fréquence à laquelle les groupements 3-*O*-sulfates sont rajoutés le long d'une chaîne HS est pour le moment difficile à déterminer. Cela étant, même si la prévalence exacte de la 3-*O*-sulfatation des HS n'a que rarement été précisée, il est estimé que 1 à 5% des disaccharides sont 3-*O*-sulfatés, en moyenne (Thacker *et al.*, 2014).

6. Origine évolutive des HS3STs

L'étude de la machinerie de biosynthèse des HS chez des organismes inférieurs a montré que le nombre de HS3STs exprimées était beaucoup plus restreint. Chez la drosophile ou le nématode, il n'existe que deux HS3STs, une de type AT et une de type gD, suggérant que les fonctions de chacune sont essentielles et non redondantes (Kamimura *et al.*, 2004 ; Teclé *et al.*, 2013). Chez des espèces ayant divergé au même moment tels que celles du genre *Planarian*, appartenant à l'embranchement des Platyhelminthes, on ne trouve qu'une seule HS3ST, qui est d'ailleurs plus proche des HS3STs de type AT. Deux autres genres regroupant plusieurs espèces ayant divergé encore plus précocement et appartenant à l'embranchement des cnidaires, *Hydra* et *Nematostella*, possèdent respectivement une et deux HS3STs, et ces trois enzymes partagent 50% d'homologie. Les espèces appartenant à l'embranchement Placozoa, qui a divergé avant l'embranchement des cnidaires, n'expriment pas d'homologues des HS3STs alors qu'elles disposent des homologues de toutes les autres enzymes modifiant les HS. Ces données suggèrent que les HS3STs sont apparues chez l'ancêtre commun des cnidaires et des bilatériens (Figure 17) (Thacker *et al.*, 2014).

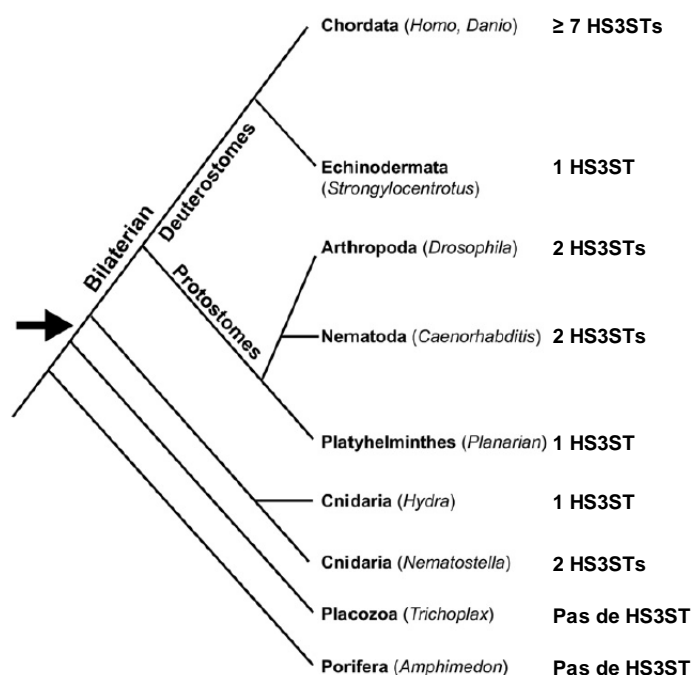


Figure 17 : Origine évolutive des HS3STs. D'après Thacker *et al.*, 2014.

G. La 6-O-désulfatation

Une fois externalisées, les chaînes HS peuvent être sujettes à une dernière modification impliquant deux 6-O-endosulfatases, Sulf-1 et Sulf-2. Ces enzymes procèdent à l'élimination de groupements 6-O-sulfates présents sur les résidus de GlcNS6S. Elles sont codées par deux gènes distincts et les séquences protéiques partagent 64% d'homologie. Leur distribution tissulaire est relativement large. Toutefois, leurs niveaux d'expression dépendent du type cellulaire et de l'environnement (Morimoto-Tomita *et al.*, 2002).

Les Sulfs sont synthétisées sous forme d'un précurseur qui, après diverses étapes de maturation, devient une forme mature qui est un hétérodimère d'une masse totale de 125 kDa. Il est composé d'une sous-unité de 75 kDa et d'une sous-unité de 50 kDa, lesquelles sont reliées par des ponts disulfures. Même si la sous-unité de 75 kDa contient le domaine catalytique, elle ne peut agir si elle est sous forme de monomère (Tang & Rosen, 2009 ; Nagamine *et al.*, 2010 ; Vivès *et al.*, 2014). Les deux enzymes sont respectivement composées de 870 à 875 acides aminés chez l'Homme et présentent quatre régions : un peptide signal situé à l'extrémité N-terminale, un domaine catalytique, un domaine hydrophile (HD) chargé positivement indispensable à leur activité enzymatique, et une région C-terminale impliquée dans l'interaction avec les résidus de GlcNS6S (Morimoto-Tomita *et al.*, 2002 ; Tang & Rosen, 2009 ; Vivès *et al.*, 2014).

Elles font partie de la famille des arylsulfatases, et présentent d'importantes homologies de séquence dans leur domaine catalytique. Cependant, le domaine HD leur est spécifique et semble être impliqué dans leur rétention à la surface cellulaire. En effet, la délétion de ce domaine entraîne la sécrétion de Sulf-1 dans le milieu extracellulaire. Le domaine HD pourrait néanmoins avoir d'autres fonctions. Des études réalisées *in vitro* avec des mutants de Sulf-1 dont le domaine HD a été délété ont montré l'importance de ce domaine dans l'activité de l'enzyme. En effet, l'analyse structurale de HS mis en présence de telles formes délétées de Sulf1 montre qu'ils contiennent un taux important de 6-*O*-sulfatation par rapport à ceux traités avec la forme sauvage, traduisant alors le manque d'activité de l'enzyme. Le domaine HD pourrait donc également intervenir dans la liaison au substrat (Frese *et al.*, 2009).

Des travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont montré que les Sulfs reconnaissent de manière préférentielle les disaccharides trisulfatés HexUA2S-GlcNS6S, mais également HexUA-GlcNS6S dans une moindre mesure. La nature du résidu d'acide uronique n'a pas d'influence sur la reconnaissance. Cependant, la présence d'un groupement sulfate sur la fonction amine des GlcN est indispensable à leur action (Ai *et al.*, 2003 ; Seffouh *et al.*, 2013). Elles agissent de manière processive et orientée, en initiant leur action à l'extrémité non-réductrice des chaînes HS (Seffouh *et al.*, 2013). La liaison des Sulfs à leur substrat dépend de la présence des groupements 6-*O*-sulfates. L'activité de l'enzyme entraîne donc la rupture de ses interactions avec la chaîne HS (Frese *et al.*, 2009). Bien que l'existence de différences de spécificité de substrat soit encore inconnue, il est établi que les Sulfs agissent selon le même mécanisme mais avec des efficacités différentes : ainsi, l'activité de Sulf-1 est supérieure à celle de Sulf-2. L'inhibition de Sulf-1 a donc des effets importants sur la structure des HS, tandis que l'inhibition de Sulf-2 ne la modifie que très peu (Nagamine *et al.*, 2012 ; Seffouh *et al.*, 2013).

L'activité des Sulfs entraîne une modification structurale des HS et donc de leurs capacités d'interaction avec de nombreux ligands, tels que des facteurs de croissance et des

morphogènes. Les Sulfs peuvent alors impacter de nombreux processus physiologiques. Ainsi, il a été montré que les capacités d'interaction de l'héparine traitée par Sulf-2 avec différents ligands protéiques tels que le VEGF et le FGF-1 étaient largement diminuées (Uchimura *et al.*, 2006). En effet, l'induction de la signalisation associée aux FGFs requiert la présence de disaccharides HexUA2S-GlcNS6S. L'activité des Sulfs diminue donc la formation des complexes ternaires HS/FGF/FGF-R et conduit à une diminution des effets cellulaires des FGFs (Wang *et al.*, 2004). A l'inverse, la 6-*O*-désulfatation peut favoriser l'activation d'autres voies, telles que la voie Wnt ou la signalisation associée aux BMPs (Ai *et al.*, 2003 ; Viviano *et al.*, 2004). En ce sens, l'activité des Sulfs permet la libération des facteurs Wnt qui sont séquestrés sur les chaînes HS. Ces médiateurs protéiques peuvent alors interagir avec leur récepteur respectif (Ai *et al.*, 2003). D'autre part, leur action conduit à la libération de Noggin, un antagoniste des BMPs qui, lorsqu'il est lié aux HS membranaires, inhibe les effets des BMPs (Viviano *et al.*, 2004).

La déficience en Sulf-1 ou en Sulf-2 chez des souris n'entraîne pas d'anomalie développementale majeure, même si les souris qui n'expriment pas Sulf-2 ont un poids inférieur. Par contre, la double déficience Sulf-1^{-/-} et Sulf-2^{-/-} perturbe le développement embryonnaire des souris, avec l'apparition de malformations des poumons, de l'œsophage, du squelette et des reins, ce qui entraîne un décès rapide des nouveaux nés. De plus, les HS produits par les souris doublement déficientes présentent un niveau de 6-*O*-sulfatation significativement plus important. Ainsi, la double déficience a des conséquences dramatiques sur le développement, qui peuvent être expliquées par un taux de 6-*O*-sulfatation supérieur. En revanche, la déficience de l'une ou l'autre des Sulfs n'a pas d'effet léthal, ce qui suggère que l'absence d'une Sulf peut être compensée par la présence de l'autre (Lamanna *et al.*, 2006 ; Ai *et al.*, 2007 ; Holst *et al.*, 2007).

H. Le concept de GAGosome

En raison de la complexité des mécanismes de biosynthèse et de la rapidité à laquelle les modifications sont effectuées, il a été proposé en 2002 par Esko & Selleck que certaines enzymes s'associent pour former un complexe macromoléculaire appelé « GAGosome ».

L'expression de différentes isoenzymes composant chaque famille d'enzymes est variable et dépend du type cellulaire et de l'environnement. La composition des complexes pourrait donc différer d'un type cellulaire à un autre. En outre, la stœchiométrie des enzymes pourrait aussi varier au sein des complexes. Il est donc probable que différents « GAGosomes » existent, conduisant à des modifications particulières des chaînes HS. Ce système pourrait expliquer la raison pour laquelle certaines chaînes HS sont très modifiées quand d'autres ne le sont quasiment pas. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour comprendre la

topologie des enzymes de modifications des HS et la manière dont leur organisation spatiale pourrait influencer les potentielles interactions qu'elles établissent entre elles.

PARTIE 3 : PROPRIETES BIOLOGIQUES DES HEPARANES SULFATES

Les HS sont capables d'interagir avec un nombre important de protéines, ils sont donc impliqués dans divers processus physiologiques mais également dans de nombreux dérèglements pathologiques. Ces interactions HS/protéines reposent sur plusieurs paramètres biochimiques modulant la spécificité de liaison (Capila & Linhardt, 2002 ; Esko & Selleck, 2002).

I. Interactions HS/protéines

A. Les protéines se liant aux HS

A ce jour, on dénombre environ 300 protéines capables de se lier aux HS ou à l'héparine, appelées HSBPs (*Heparan Sulfate Binding Protein*). On qualifie de HSBP une protéine qui est capable de se lier aux HS dans des conditions physiologiques en termes de pH, température, concentrations en sels et en protéines. L'activité des HS résultant de leur localisation membranaire ou extracellulaire, une protéine cytosolique ne sera pas considérée comme étant une HSBP même si elle est capable de se lier aux HS *in vitro* (Ori *et al.*, 2011). Les HSBPs sont capables de se lier à plusieurs séquences HS, et une même séquence HS peut interagir avec différentes HSBPs, comme c'est le cas pour les HS qui reconnaissent des facteurs de croissance et leurs récepteurs. En outre, l'affinité des HSBPs pour les HS est très variable, les constantes de dissociations K_d pouvant aller de 1 nM à 10 μ M. Elles ont des structures très différentes et ne sont pas liées entre elles par une origine ou une fonction commune. C'est en ceci qu'elles diffèrent des lectines, lesquelles présentent un nombre de motifs de fixation aux glycanes ou de structures tridimensionnelles restreint (Varki *et al.*, 2009).

On distingue plusieurs catégories de HSBPs, dont les principales sont : les chimiokines et cytokines, les morphogènes et facteurs de croissance, les facteurs de coagulation et leurs inhibiteurs, les protéines extracellulaires comme les collagènes, certains récepteurs transmembranaires et des protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire. Il existe d'autres catégories de HSBPs mais qui sont moins représentées toutefois, comme les protéines impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines, ou les protéines amyloïdes. Les HS sont également capables d'interagir avec des protéines d'agents pathogènes (Xu *et al.*, 2014).

B. Fondamentaux des interactions avec les HS

En raison de la présence de nombreux groupements sulfates chargés négativement, les chaînes HS sont des molécules à fort caractère anionique. Ainsi, les liaisons des HSBPs aux HS mettent essentiellement en jeu des interactions ioniques qui s'établissent entre les groupements sulfates des HS et des acides aminés basiques des protéines tels que l'arginine, la lysine et, dans une moindre mesure, l'histidine (Fromm *et al.*, 1997a). Cela étant, les liaisons

que l'héparine forme avec l'arginine sont 2,5 fois plus fortes que celles formées avec la lysine, le groupement guanidine pouvant établir de plus fortes interactions électrostatiques (Hileman *et al.*, 1998a). Enfin, la longueur minimale d'un fragment d'héparine pouvant interagir est de 25 à 50 Å, ce qui équivaut à un oligosaccharide de 6 à 12 unités. (Ghandi *et al.*, 2008). D'ailleurs, il a été suggéré qu'une distance d'environ 20 Å entre deux acides aminés basiques était nécessaire pour l'interaction, quel que soit le repliement des protéines (Margalit *et al.*, 1993).

Grâce à différentes études structurales, des séquences protéiques consensus de liaison riches en acides aminés basiques ont pu être déterminées. La première étude de ce genre a mené à la détermination de deux séquences consensus : XBBXBX et XBBBXXBX, où B représente un acide aminé basique et X un acide aminé hydrophobe. En fait, si le fragment peptidique composant la première séquence est organisé en brins β , les acides aminés basiques sont alors orientés vers l'extérieur tandis que ceux qui sont hydrophobes sont dirigés vers l'intérieur de la protéine. De même, si les acides aminés composant la deuxième séquence sont organisés en hélice α , alors les acides aminés basiques sont tous retrouvés au niveau de la même « face » de l'hélice qui peut être orientée vers l'extérieur, quand les acides aminés hydrophobes se retrouvent à l'intérieur de la protéine. On parle d'hélice amphipathique (Figure 18) (Cardin & Weintraub, 1989). Une troisième séquence consensus a par la suite été proposée après analyse de l'interaction entre l'héparine et le facteur de von Willebrand. Il s'agit de la séquence XXBBXXBBBXXBBX, qui peut aussi être retrouvée dans d'autres protéines (Sobel *et al.*, 1992).

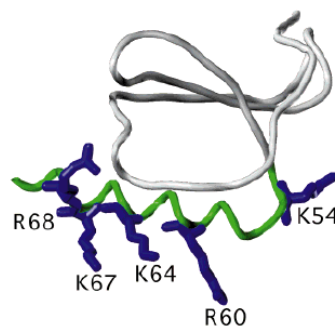


Figure 18 : Exemple d'un motif linéaire XBBBXXBX organisé en hélice α . Les acides aminés sont orientés vers la même face de l'hélice. La séquence consensus est en vert, les résidus d'acides aminés basiques (arginine et lysine) sont en bleu et reste de la protéine est en blanc. D'après Hileman *et al.*, 1998a.

C. Importance des conformations des HS et des protéines

Les structures secondaires et tertiaires des HSBPs sont donc déterminantes dans l'établissement des interactions avec les HS. Le cas le mieux décrit est celui des FGFs. L'élucidation des structures tertiaires des FGF acide ou basique par cristallographie et RMN, qu'ils soient en interaction ou non avec l'héparine, a démontré qu'ils présentaient une topologie conservée malgré les différences dans la séquence en acides aminés (Zhu *et al.*, 1993 ; Faham

et al., 1996). Le motif de liaison à l'héparine de ces facteurs présente une séquence et une structure tridimensionnelle qui sont particulières : TXXBXXTBXXTBB, où B et X représentent respectivement des acides aminés basiques et hydrophobes, et T représente des acides aminés formant un coude dans l'espace. Ce type de motif est également retrouvé chez le TGF- β 1 (Figure 19A) (Hileman *et al.*, 1998a). Plusieurs travaux soulignent l'importance du repliement de ces séquences. Un peptide de synthèse cyclique dont la séquence est homologue à celle du domaine de liaison à l'héparine du FGF acide établit des liaisons plus fortes que le même peptide linéaire (Fromm *et al.*, 1997b). De plus, un peptide synthétique dont la séquence est analogue à celle du motif de fixation des FGFs se fixe beaucoup mieux à l'héparine que le même peptide auquel a été ajouté une proline après le second coude, les résidus de proline induisant une cassure dans la structure tridimensionnelle des protéines (Fromm *et al.*, 1997b). Cela étant, la présence de résidus de proline ne nuit pas forcément à la mise en place des interactions HS/HSBPs. Des données suggèrent qu'ils pourraient se situer à la fin des séquences protéiques se liant à l'héparine pour induire l'extériorisation de ces domaines à la surface de la protéine et donc faciliter leur accès à l'héparine (Caldwell *et al.*, 1996). De plus, dans les domaines d'interaction aux HS, on peut aussi trouver des résidus à petite chaîne latérale comme la sérine ou la glycine : ces acides aminés de faible encombrement stérique permettent d'augmenter la flexibilité de la macromolécule pour augmenter l'affinité vis-à-vis de l'héparine (Caldwell *et al.*, 1996).

Comme la majorité des travaux relatifs aux interactions entre les HS et les protéines a été réalisée avec de l'héparine, c'est l'influence de la structure de l'héparine en particulier, et non des HS en général, qui a été étudiée. En solution, l'héparine existe sous forme hélicoïdale. Les résidus de GlcN et GlcUA adoptent une conformation 4C_1 stable, tandis que la conformation des résidus de IdoUA varie lorsqu'ils portent un sulfate sur l'hydroxyle en position 2, les conformations adoptées étant les conformations chaise 1C_4 et bateau 2S_0 (Figure 19B). Dans le cas d'un IdoUA2S, la conformation 2S_0 semble favorisée puisqu'elle permet de minimiser les interactions 1,3 diaxiales. En effet, lorsqu'un IdoUA2S est en conformation 1C_4 , quatre de ses substituants sont en position axial quand seul le groupement carboxylate est en position équatoriale (Mikhailov *et al.*, 1996 ; Mikhailov *et al.*, 1997). La conformation adoptée par les IdoUA au sein de l'héparine dépend non seulement de l'état de substitution du résidu, mais aussi du résidu de GlcN adjacent. Cela étant, ces deux conformations sont d'énergie similaire, et les IdoUA peuvent basculer rapidement d'une conformation à l'autre au sein d'une même chaîne. L'héparine, bien qu'étant un polysaccharide linéaire, présente ainsi une certaine flexibilité (Capila & Linhardt, 2002). Il convient toutefois de nuancer ce propos. En effet, les liaisons glycosidiques sont assez rigides, et les changements de conformation des IdoUA ne modifient donc que très légèrement la forme de l'héparine (Figure 19C). En revanche,

l'orientation des groupements 2-*O*-sulfates portés par les IdoUA est très différente d'une conformation à l'autre, ce qui modifie les capacités d'interaction de l'héparine avec les protéines (Coombe & Kett, 2005). En solution, ces deux conformations sont présentes à l'équilibre, mais la fixation d'une protéine déplace cet équilibre vers la conformation la plus avantageuse énergétiquement. Par exemple, il a été montré que la conformation 2S_0 des IdoUA jouait un rôle important dans la fixation de l'antithrombine-III (AT-III) à l'héparine (Das *et al.*, 2001). Dans le cas de la liaison du FGF-2 à un hexasaccharide d'héparine, la situation est plus complexe. Le résidu de IdoUA en position 3 adopte une conformation 1C_4 tandis que celui en position 5 a été retrouvé en conformation 2S_0 (Faham *et al.*, 1996).

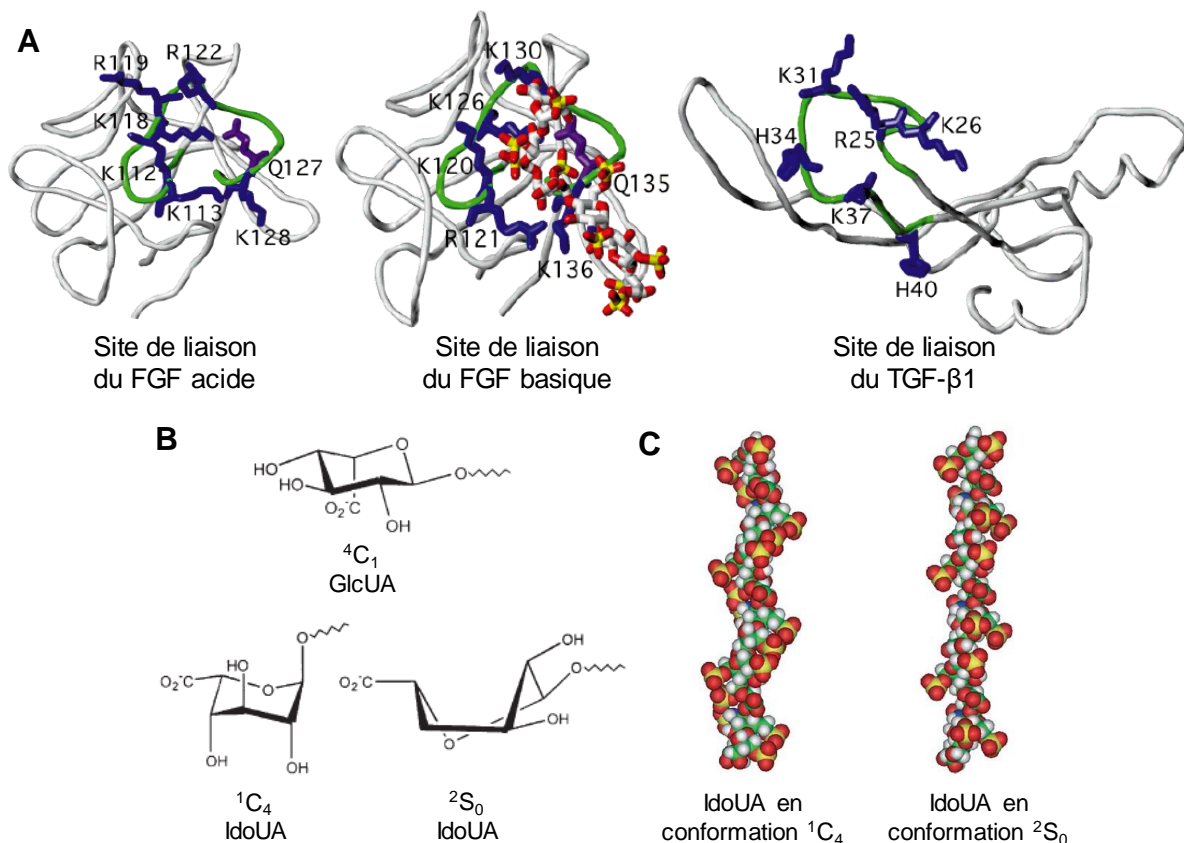


Figure 19 : Structures tridimensionnelles de différents sites protéiques de liaisons aux HS et à l'héparine. (A) Représentation de trois sites de liaisons présentant le motif TXXBXXTBXXXTBB. Le FGF basique est lié à un hexasaccharide dérivé d'héparine où les groupements sulfates sont montrés avec les atomes d'oxygène en rouge et les atomes de soufre en jaune. Dans tous les cas, les séquences consensus sont montrées en vert, les résidus d'acides aminés basiques sont en bleu, la glutamine est en violet et le reste de la protéine est en blanc. D'après Hileman *et al.*, 1998a. (B) Conformations des acides uroniques composant l'héparine et les HS. D'après Coombe & Kett., 2005. (C) Structure tridimensionnelle de l'héparine déterminée par RMN selon la conformation des résidus de IdoUA. Les groupements sulfates sont montrés avec les atomes d'oxygène en rouge et les atomes de soufre en jaune. D'après Coombe & Kett, 2005.

Cela étant, peu de données sont disponibles concernant la structure tridimensionnelle des HS. Il est probable que les domaines NS hautement sulfatés adoptent la structure hélicoïdale de l'héparine et sa flexibilité, alors que les domaines NA peu modifiés et dépourvus d'IdoUA pourraient manquer de flexibilité. Cependant, plusieurs travaux suggèrent que le

degré de rotation autour des liaisons glycosidiques impliquant des résidus de GlcUA en conformation 1C_4 est supérieur à celui de liaisons impliquant des IdoUA (Mulloy & Forster, 2000 ; Xu *et al.*, 2014). En fait, il est envisageable que ces rotations facilitent le positionnement correct de deux domaines NS d'une chaîne HS pour favoriser l'interaction avec les protéines.

D. Autres paramètres modulant les interactions

Comme les HS présentent de nombreuses charges négatives, plusieurs études ont porté sur le rôle des contre-ions dans les liaisons des HS avec leurs ligands. Les interactions peuvent être régulées par des cations divalents libres, notamment les ions Ca^{2+} , Zn^{2+} , et Mn^{2+} . Le plus souvent, ces cations sont primordiaux pour l'établissement des interactions et stabilisent les complexes formés. Par exemple, la liaison de l'annexine A2 sur les HS dépend de la présence d'ions Ca^{2+} (Figure 20A) (Shao *et al.*, 2006). Les cations divalents sont également nécessaires à l'interaction entre les prions et les HS. En effet, la liaison des histidines protonées à des ions Cu^{2+} entraîne l'oligomérisation des protéines, ce qui favorise leur interaction avec les chaînes HS (González-Iglesias *et al.*, 2002). Les cations divalents ne sont, cependant, pas forcément nécessaires pour l'interaction des HS avec leurs ligands. Par exemple, ils ne sont pas indispensables à la liaison des HS avec les lipoprotéines. Ils sont en revanche impliqués dans la stabilisation des complexes qu'elles forment avec les HS (Srinivasan *et al.*, 1975). D'autre part, les cations divalents peuvent jouer un rôle dans les changements conformationnels des protéines ou de l'héparine pour favoriser les liaisons. Lors de l'interaction de l'héparine avec l'annexine V, les ions calcium présents induisent un changement de conformation de la protéine en créant une boucle nécessaire à l'interaction (Figure 20B) (Capila *et al.*, 2001). De plus, les ions Zn^{2+} interagissent de manière spécifique avec l'héparine au niveau des acides iduroniques principalement. En fait, des données obtenues par RMN montrent que ces ions modulent la conformation des iduronates auxquels ils sont liés (Parrish & Fair, 1981 ; Whitfield *et al.*, 1992).

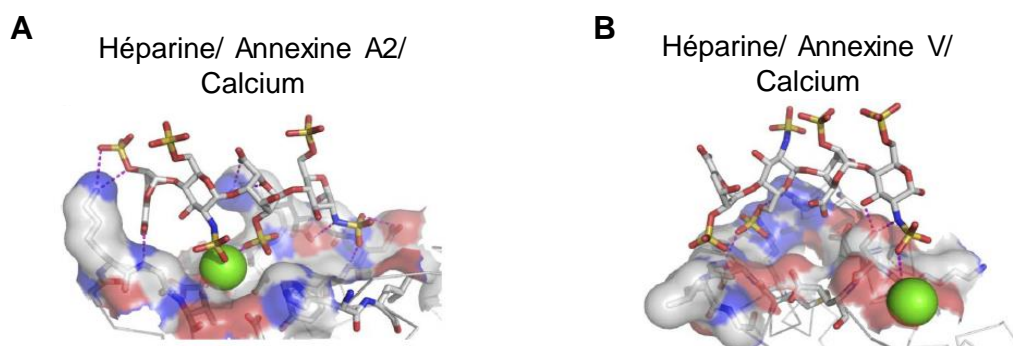


Figure 20 : Rôles du calcium dans l'interaction de l'héparine avec les annexines A2 (A) et V (B). Les ions Ca^{2+} sont représentés par des sphères vertes et les liaisons hydrogènes sont représentées par des traits en pointillés violets. D'après Imberty *et al.*, 2006.

Etant donné l'importance des groupements sulfates dans les interactions des HS avec les HSBPs, le pH environnant peut également jouer un rôle prépondérant. Une telle régulation est tout à fait envisageable *in vivo*, puisqu'on observe une baisse de pH notamment lors de la réponse inflammatoire mais aussi à cause du métabolisme des cellules cancéreuses (Lardner, 2001 ; Justus *et al.*, 2013). Les interactions des HS avec la sélénoprotéine P, le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), ou la chimiokine SDF-1 (*Stromal Cell-Derived Factor-1*), entre autres, ont été décrites comme étant régulées par le pH (Wettreich *et al.*, 1999 ; Arteel *et al.*, 2000 ; Veldkamp *et al.*, 2005). En particulier, le pH a des effets lorsque les sites de liaisons aux HS sont riches en histidine. Le pKa de la chaîne latérale étant d'environ 6,5, une acidification du milieu jusqu'à un pH proche de 6 conduit à une protonation importante de cet acide aminé et donc à une augmentation de la proportion d'histidines chargées positivement. *In fine*, une telle chute de pH favorise les interactions entre les histidines et les groupements sulfates des HS (Ghandi *et al.*, 2008). Par exemple, la liaison de la protéine HPRG (*Histidine Proline-Rich Protein*) est minimale à pH neutre, mais augmente à son maximum lorsque le pH diminue à 6,5. La présence de contre-ions peut d'ailleurs moduler l'interaction lorsque le pH varie. Si l'interaction est favorisée aux mêmes pH en présence de concentration de l'ordre du nanomolaire en Cu^{2+} , la présence de Zn^{2+} favorise l'interaction à pH 7,4. Dans ces conditions, les ions zinc contribuent directement à la charge positive de la protéine, expliquant alors le phénomène (Borza & Morgan, 1997).

E. Liaisons de van der Waals, hydrogènes et hydrophobes

Même si les forces électrostatiques peuvent jouer un rôle prédominant dans l'interaction des HS avec les HSBPs, d'autres types de liaisons sont susceptibles d'intervenir et même d'être indispensables. En effet, la contribution non ionique peut représenter une grande partie voire la quasi-totalité de l'énergie libre de fixation (Xu *et al.*, 2014). Par exemple, lors de l'interaction entre l'héparine et le FGF-2, les interactions non ioniques contribuent pour environ 70% de l'énergie libre de liaison (Thompson *et al.*, 1994). La fixation d'une protéine sur les HS nécessite donc la mise en place de liaisons de van der Waals et de liaisons hydrogènes. En ce sens, les domaines protéiques de liaison à l'héparine ou aux HS contiennent de l'asparagine ou de la glutamine, qui sont des acides aminés capables de former des liaisons hydrogènes (Gandhi *et al.*, 2008). Il a été montré que dans le cas de l'interaction de BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) avec les HS, seuls 6% de l'énergie libre correspondent à des liaisons ioniques, l'interaction nécessitant essentiellement la mise en place de liaisons hydrogènes établies avec les acides aminés polaires de la protéine (Hileman *et al.*, 1998b). L'interaction des HS avec les protéines peut également faire intervenir des liaisons hydrophobes impliquant le squelette carboné des HS. Des études de la liaison de l'héparine à un peptide analogue d'un fragment de l'AT-III par RMN ont montré qu'un résidu de tyrosine était impliqué dans la mise en place de liaisons

hydrophobes spécifiques avec les groupements *N*-acétyl d'un pentasaccharide d'héparine (Bae *et al.*, 1994).

F. Spécificité des interactions

L'interaction entre les HS et les protéines mettant en jeu des liaisons ioniques, hydrogènes et de van der Waals, on peut se poser la question du degré de spécificité de la reconnaissance entre les deux partenaires. En fait, la notion de spécificité dépend du ligand : des modifications très particulières de la séquences HS sont nécessaires pour l'interaction avec le FGF-2 ou l'AT-III (Esko & Selleck, 2002). Par exemple, l'interaction avec le FGF-2 dépend de la présence de résidus IdoUA2S et de GlcNS (Turnbull *et al.*, 1992). L'interaction est établie grâce à un seul disaccharide de la séquence qui forme 9 liaisons hydrogènes avec le FGF-2, dont six sont dues à la présence du résidu de IdoUA2S et trois à celle de la GlcNS6S (Figure 21) (Faham *et al.*, 1996). Bien que le groupement 6-*O*-sulfate de la GlcNS6S ne soit pas essentiel à l'interaction avec le FGF-2, il apparait indispensable à l'activation du récepteur FGF-R en établissant avec ce dernier une liaison hydrogène (Pye *et al.*, 1998). Toutefois, même si le positionnement des groupements sulfates a été identifié comme étant important pour la mise en place de nombreuses interactions, peu de séquences HS de liaison avec des ligands spécifiques ont été décrites. En effet, il est pour le moment très difficile de définir des séquences HS d'interactions, comme cela a pu être fait pour l'AT-III, en raison d'un manque d'oligosaccharides de structures définies et de difficultés techniques (Xu *et al.*, 2014).

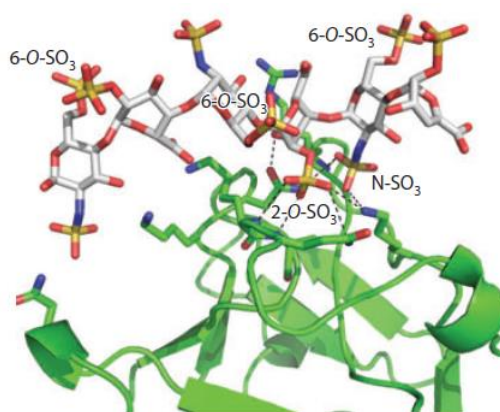


Figure 21 : Interaction d'un hexasaccharide dérivé d'héparine avec le FGF-2.

Les acides aminés du FGF-2 interagissant avec les HS sont représentés en bâtons vert. L'héparine est représentée en bâtons blancs, avec les atomes d'oxygène en rouge et les atomes de soufre en jaune. Les interactions ioniques et non ioniques sont représentées en pointillés. (D'après Xu *et al.*, 2014).

Finalement, la spécificité de la liaison HS/HSBP peut dépendre de l'organisation de la chaîne HS en différents domaines. Certaines protéines sont capables d'interagir avec plusieurs domaines NS de longueur variable et espacés par des domaines NA plus ou moins longs. De telles interactions ont été décrites pour l'IFN (interféron)- γ , la chimiokine PF4 (*Platelet Factor 4*), l'IL (interleukine)-8 et MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein-1 α*) (Lortat-Jacob *et al.*,

1995 ; Stringer & Gallagher, 1997 ; Spillmann *et al.*, 1998 ; Stringer *et al.*, 2002). Des études structurales de l'interaction entre l'IL-8 et les HS montrent que l'affinité de l'IL-8 monomérique est trop faible pour être observée dans des conditions physiologiques. La cytokine interagit en fait sous forme de dimère avec des oligosaccharides de degré de polymérisation (dp) 18 comportant au moins deux domaines NS de dp4 ou dp6. Chaque sous-unité du dimère se lie à un domaine NS de l'oligosaccharide, lequel pourrait être replié en forme de fer à cheval et présenter deux régions hélicoïdales antiparallèles à la protéine (Spillmann *et al.*, 1998).

Enfin, il est également possible que les HS établissent des interactions non spécifiques avec certaines protéines. La liaison ne dépend alors que de la densité en charges négatives des HS. En ce sens, il a été montré que l'interaction de la thrombine avec les HS dépendait très peu des liaisons ioniques mais très fortement de la concentration en sel, contrairement aux liaisons entre les HS et le FGF-2 ou l'AT-III, et que la liaison était favorisée lorsque la longueur des fragments d'héparine était augmentée (Olson *et al.*, 1991). L'existence des interactions non spécifiques est d'autant plus probable *in vivo* que la perte de sulfates à certaines positions peut être compensée par l'augmentation de groupements sulfates à d'autres positions de la chaîne HS (Kamimura *et al.*, 2006).

II. Mécanismes cellulaires impliquant les HS

Du fait de leur large hétérogénéité structurale, les HS sont capables d'interagir avec un nombre important de protéines, ils sont donc impliqués dans plusieurs processus physiologiques mais également dans des dérèglements pathologiques (Figure 22). Parmi les ligands des HS, on trouve des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, des inhibiteurs de protéase mais aussi des protéines virales. Ainsi, la liaison de ces protéines aux HS permet d'induire des modifications de la physiologie cellulaire et de son environnement (Sasisekharan & Venkataraman, 2000 ; Bishop *et al.*, 2007).

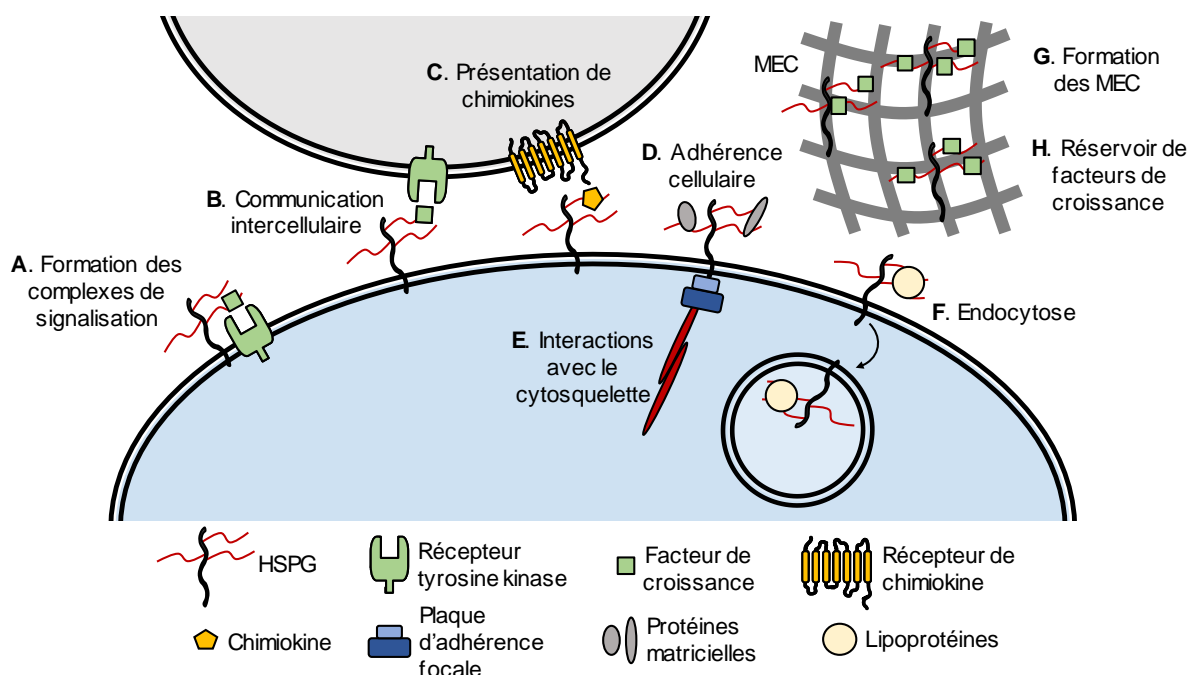


Figure 22 : Implications des HS dans la régulation de la physiologie cellulaire. D'après Bishop *et al.*, 2007.

A. Régulation de la formation des complexes de signalisation

L'activité biologique d'un grand nombre de facteurs extracellulaires est régulée par les HS (Figure 22A). De manière générale, l'action d'un facteur extracellulaire dépend de sa fixation à son récepteur membranaire, ce qui entraîne l'activation du récepteur et permet d'induire la cascade de signalisation et donc les effets cellulaires associés. Les HSBPs sont capables d'interagir avec les chaînes HS d'une part, et leur récepteur d'autre part, les sites de liaison étant distincts le plus souvent. Ce système d'interaction suggère que les HS sont impliqués dans la présentation des facteurs à leur récepteur et/ou dans la stabilisation des complexes de signalisation : ils peuvent servir de co-récepteurs (Lin *et al.*, 1999 ; Delehedde *et al.*, 2000 ; Turnbull *et al.*, 2001 ; Pomin *et al.*, 2016). Par exemple, lorsque les cellules sont dénuées de HS membranaires, le FGF-2 se fixe à son récepteur mais ne peut induire que des signaux intracellulaires transitoires qui ne sont donc pas assez soutenus pour entraîner une

division cellulaire. En revanche, en présence d'héparine soluble, la réponse au FGF-2 est complètement restaurée, indiquant que les HS sont nécessaires à la stabilisation du complexe FGF-2/FGFR pour assurer son maintien et induire des effets continus (Delehedde *et al.*, 2000).

Parmi les interactions entre les HS et les HSBPs, celles mettant en jeu les FGFs sont probablement les mieux décrites. Les FGFs sont une grande famille de facteurs de croissance impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation ou encore l'angiogenèse, et ils présentent une affinité importante pour les HS (Zulueta *et al.*, 2018). Les récepteurs aux FGFs, ou FGF-R, sont également des HSBPs, indiquant que les deux membres du complexe ligand/récepteur peuvent interagir simultanément avec les HS (Kan *et al.*, 1993). En plus d'interagir avec les FGFs, les HS favorisent leur sécrétion et permettent leur diffusion dans les matrices extracellulaires (Zehe *et al.*, 2006 ; Duchesne *et al.*, 2012). Des études structurales montrent que la stœchiométrie des complexes FGF/FGF-R/héparine n'est pas toujours la même (Figure 23). Une première étude montre qu'un dp10 d'héparine établit de nombreux contacts aussi bien avec le FGF-2 qu'avec le FGF-R1, stabilisant ainsi l'interaction (Figure 23B). On a donc formation d'un complexe stable de stœchiométrie 1:1:1 qui peut interagir avec un autre complexe déjà formé grâce à des contacts directs entre les hétérodimères FGF-2/FGF-R1. Ceci aboutit à la formation d'un complexe symétrique de stœchiométrie 2:2:2 au sein duquel le FGF-2 d'un complexe ternaire peut interagir avec le FGF-R1 de l'autre, tout en étant stabilisé par les dp10 d'héparine (Schlessinger *et al.*, 2000) (Figure 23C et D). Cependant, d'autres travaux indiquent que le FGF-1 forme avec le FGF-R2 et l'héparine un complexe ternaire asymétrique présentant une stœchiométrie 2:2:1. Selon ce modèle, un dimère de FGFs interagit avec l'héparine et un FGF-R pour former un complexe stable 2:1:1 (Figure 23F), ce qui permet ensuite la dimérisation des récepteurs : l'ensemble devient alors un complexe 2:2:1 (Figure 23G et H). Dans ce cas, les deux complexes ligand/récepteur sont associés autour du même dp10 d'héparine, qui interagit avec les deux FGF-2 mais n'est en contact qu'avec un seul récepteur. Par conséquent, les interactions protéine/protéine sont limitées dans ce modèle, à la différence du précédent, soulignant le rôle crucial de la chaîne polysaccharidique (Pellegrini *et al.*, 2000). Il a également été montré que le degré de sulfatation des chaînes HS était primordial pour la formation des complexes ternaires : les groupements *N*- et 2-*O*-sulfates sont indispensables à la fixation des FGFs et les groupements 6-*O*-sulfates sont nécessaires à la formation des complexes ternaires (Lyon & Gallagher, 1998 ; Lundin *et al.*, 2000). Ainsi, le mécanisme d'interaction du FGF avec son récepteur et les chaînes HS pourrait dépendre du FGF et du récepteur mis en jeu, mais aussi de la structure des chaînes HS membranaires (Capila et Linhardt, 2002 ; Pomin *et al.*, 2016).

En outre, les HS peuvent intervenir à un autre niveau dans la régulation de l'activité de médiateurs protéiques. En fixant les morphogènes et facteurs de croissance, ils permettent de

réguler leur gradient. Ce système permet de limiter la diffusion de ces facteurs et aboutit à une augmentation de leur concentration locale. Les effets de la protéine *Wnt* sont notamment régulés par ce mécanisme (Hacker *et al.*, 1997 ; Lander *et al.*, 2002). Il a également été démontré que le CD44, en interagissant avec le FGF-1 *via* ses chaînes HS, participe à la formation d'un réservoir de ce facteur (Zhen *et al.*, 2018). Un autre exemple concerne *Indian Hedgehog* (IHH), qui a besoin de se fixer aux HS pour induire ses effets. Il a été montré que des souris déficientes en EXT1, donc dépourvues d'HS, présentaient des anomalies de formation du squelette, qui ont été reliées à une diffusion de la concentration en IHH au niveau des sites d'ossification (Koziel *et al.*, 2004).

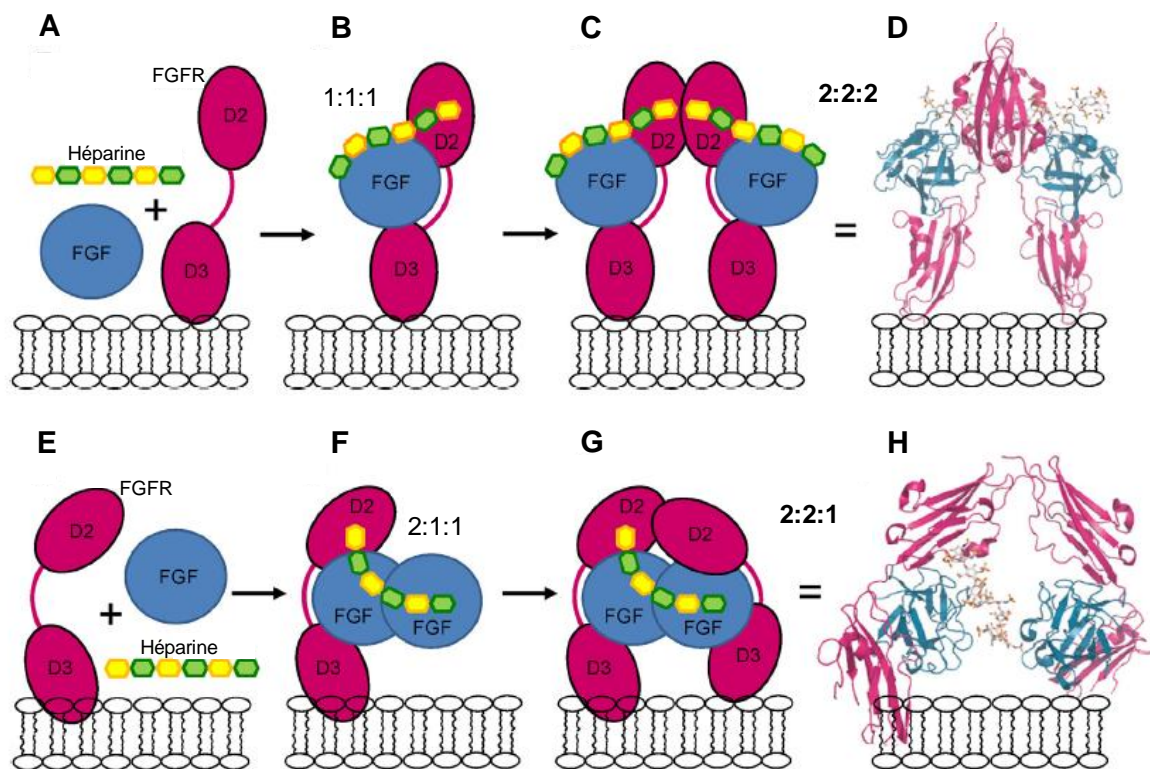


Figure 23 : Modèles de formation des différents complexes ternaires FGF/FGF-R/héparine. D'après Pomin *et al.*, 2016.

B. « Cross-talk » cellulaire

Les HS, en plus d'induire des effets biologiques chez la cellule qui les porte, peuvent agir « en trans » sur des cellules voisines : on parle de transactivation (Figure 22B). C'est Yost qui, en 1992, a suggéré le premier un rôle des HS dans la transactivation du mésoderme par l'ectoderme pendant le développement du xénope. Par la suite, il a été montré que c'est en fait le syndecan-2 exprimé par les cellules de l'ectoderme qui active des récepteurs des cellules mésodermiques, déterminant alors la formation de l'axe gauche-droite. Plus précisément, des mutations des sites de fixations des HS sur le syndecan-2 montrent qu'en absence de

polysaccharides, la formation du cœur est perturbée, confirmant que ce sont bien les HS et non le *core* protéique qui sont à l'origine de ce mécanisme (Kramer *et al.*, 2002).

Par ailleurs, un mécanisme de transactivation impliquant les HS a aussi été observé lors de l'angiogenèse chez la souris (Jakobsson *et al.*, 2006). Les cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins sont entourées de cellules musculaires lisses. Afin de démontrer le *cross-talk* cellulaire, les auteurs ont préparé des cellules souches de souris modifiées qui présentaient soit un défaut d'expression des NDST1 et 2, soit un défaut d'expression du VEGF-R2, un récepteur du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Dès lors, ils ont pu reconstituer des vaisseaux sanguins composés de cellules endothéliales dont les HS n'étaient pas sulfatés mais qui exprimaient le VEGF-R2 et de cellules musculaires lisses sous-jacentes portant des HS sulfatés mais n'exprimant pas VEGF-R2. Les HS des cellules endothéliales étaient donc incapables de présenter le VEGF au VEGF-R2 et de stabiliser l'interaction. Cependant, dans ces conditions, les auteurs ont observé une augmentation du développement des vaisseaux sanguins et de la phosphorylation du VEGF-R2 des cellules endothéliales traduisant une augmentation de son activation. En fait, le VEGF a pu être présenté au VEGF-R2 des cellules endothéliales par l'intermédiaire des HS présents à la surface des cellules musculaires lisses. L'utilisation des héparinases I, II et III a conduit à une diminution du nombre de vaisseaux, confirmant le rôle primordial des chaînes HS des cellules musculaires lisses de ce modèle.

C. Migration cellulaire

Voilà plus de quarante ans que l'on a observé pour la première fois des interactions entre les HS et les chimiokines (Rosenberg *et al.*, 1973 ; Handin *et al.*, 1976). Les chimiokines constituent une famille de protéines représentée par une cinquantaine de membres dont la majorité est capable d'interagir avec les HS. Elles peuvent être réparties en quatre sous-familles selon la position des cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures : C, CC, CXC et CX3C. Cette classification a conduit à l'établissement de la nomenclature actuelle, selon le type de cystéines qu'elles contiennent, suivi d'un L (pour ligand) et d'un numéro. Elles sont impliquées dans la migration de leucocytes circulant dans le contexte de l'immuno-surveillance et de l'inflammation, mais également dans la migration d'autres types cellulaires lors de processus variés tels que le développement, l'angiogenèse ou encore la cicatrisation. Ce sont des protéines fortement basiques, qui peuvent donc interagir avec des molécules qui présentent un caractère anionique très prononcé telles que les HS (Figure 22C) (Wang *et al.*, 2013 ; Proudfoot *et al.*, 2017).

Les HS sont impliqués dans différents mécanismes modulant l'activité chimio-attractante des chimiokines. Premièrement, en fixant les chimiokines, ils permettent de les protéger de la protéolyse (Sadir *et al.*, 2004) et d'induire la formation d'oligomères de certaines chimiokines

(Imberty *et al.*, 2007). En effet, bien que de nombreuses chimiokines soient capables de former des oligomères sans l'intervention des HS, il a été montré que la formation d'oligomère de CCL5 (RANTES) n'était induite que par les HS, qui sont d'autant plus importants que les oligomères de CCL5 sont nécessaires à l'activité chimio-attractante maximale (Johnson *et al.*, 2004). La formation d'oligomères peut également favoriser l'interaction avec les HS. En effet, ces complexes protéiques peuvent présenter une affinité plus importante pour les HS comme c'est le cas pour CXCL1 (Sawant *et al.*, 2016). Différentes études montrent également que l'oligomérisation de certaines chimiokines interagissant avec les HS est essentielle à leur activité *in vivo*. Par exemple, lorsque les chimiokines CCL2, CCL4 et CCL5 sont mutées dans leurs sites de fixation aux HS, elles ne sont plus capables d'interagir avec les HS et ne forment plus d'oligomères. De ce fait, elles n'induisent plus de recrutement cellulaire dans un modèle murin. Ces données sont renforcées par le fait que l'utilisation de variants strictement monomériques de ces chimiokines conduit aux mêmes résultats (Proudfoot *et al.*, 2003). De plus, des tests de recrutement cellulaire montrent que les variants monomériques et dimériques de CXCL21 induisent des effets moindres par rapport à la forme sauvage de la chimiokine (Sawant *et al.*, 2016).

Deuxièmement, les HS jouent un rôle important dans la formation d'un gradient de chimiokines favorisant la migration leucocytaire. Les chimiokines sécrétées dans la lumière de l'endothélium interagissent avec les chaînes polysaccharidiques des HSPGs présents au niveau de la face luminale des cellules endothéliales, ce qui les immobilise : il en résulte donc l'établissement d'un gradient (Figure 24). Ce système permet de fournir des signaux directionnels aux leucocytes circulant pour guider leur migration sur le lieu de l'inflammation. En immobilisant les chimiokines, les HS empêchent aussi leur diffusion pour confiner les signaux inflammatoires sur un lieu restreint. De ce fait, les possibilités d'interaction entre les chimiokines et leurs récepteurs sont limitées dans l'espace et le temps, ce qui pourrait éviter l'activation des leucocytes avant qu'ils ne soient arrivés sur le lieu de l'inflammation (Li *et al.*, 2002 ; Parish *et al.*, 2006 ; Proudfoot *et al.*, 2017)

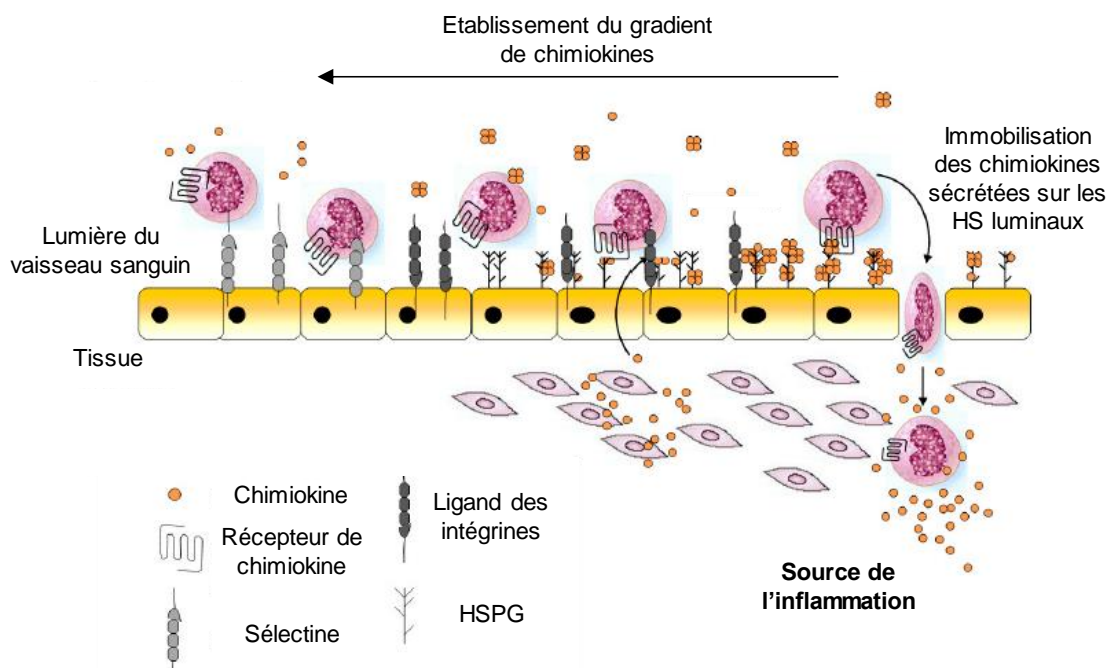


Figure 24 : Rôle des HS dans le recrutement des leucocytes. L'immobilisation des chimiokines sous forme d'oligomères sur les chaînes HS des protéoglycanes présents au niveau de la face luminale des cellules endothéliales conduit à la formation d'un gradient de concentration, la zone où la chimiokine est la plus concentrée étant proche du lieu de l'inflammation. Ce gradient guide la migration des leucocytes et aboutit à la diapédèse. Plusieurs chimiokines différentes peuvent être mises en jeu. D'après Proudfoot *et al.*, 2017.

D. Adhérence cellulaire

Les HS pouvant interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, les laminines, la vitronectine, la thrombospondine et certaines fibrilles de collagène, il n'est pas étonnant de les retrouver impliqués dans les phénomènes d'adhérence cellulaire (Figure 22D et E) (Bernfield *et al.*, 1999). Par exemple, le syndécan-1 est impliqué dans la régulation de l'activation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ grâce à une interaction entre le domaine extracellulaire des protéoglycanes et les sous-unités β des intégrines. Ce processus nécessite notamment le rassemblement des syndécans-1 en cluster et des interactions avec la vitronectine. Cependant, le rôle des chaînes HS reste peu clair. Il a été proposé qu'elles pouvaient être impliquées dans le *clustering* du syndécan-1 ou bien dans l'interaction du syndécan-1 avec la vitronectine (Beauvais *et al.*, 2004 ; McQuade *et al.*, 2006 ; Beauvais *et al.*, 2009).

Le syndécan-4 est un protéoglycane très important dans la formation des plaques d'adhérence (Oh & Couchman, 2004). Sa surexpression en cellules CHO conduit à une augmentation de la formation des plaques d'adhérence, à une réorganisation du cytosquelette ainsi qu'à une diminution de la motilité cellulaire selon un mécanisme qui implique la petite protéine G Rho (Longley *et al.*, 1999 ; Saoncella *et al.*, 1999). Des travaux précisent l'implication des chaînes HS du syndécan-4 dans la formation des plaques d'adhérence focale.

Des cellules en contact de *coverslips* recouvertes d'un domaine particulier de la fibronectine, le domaine de liaison à l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, sont capables de s'étaler mais ne forment pas de point d'adhérence focale (Figure 25A). Ce n'est qu'après l'ajout d'un autre domaine de la fibronectine dans le milieu, celui permettant la fixation à l'héparine, que les cellules sont capables de former des plaques d'adhérence focale, indiquant alors l'importance des chaînes HS dans l'adhérence (Figure 25B) (Woods *et al.*, 2000 ; Okina *et al.*, 2009). Et ce sont bien les chaînes HS du syndécan-4 qui sont à l'origine de ce phénomène, puisque des souris déficientes en syndécan-4 ne répondent pas à une stimulation par le domaine de liaison à l'héparine de la fibronectine (Ishiguro *et al.*, 2000). Cette interaction nécessiterait un polysaccharide d'au moins quatorze résidus avec présence de groupements *N*- et 6-*O*- sulfates, les groupements 2-*O*- sulfates n'étant ici pas essentiels (Mahalingam *et al.*, 2007).

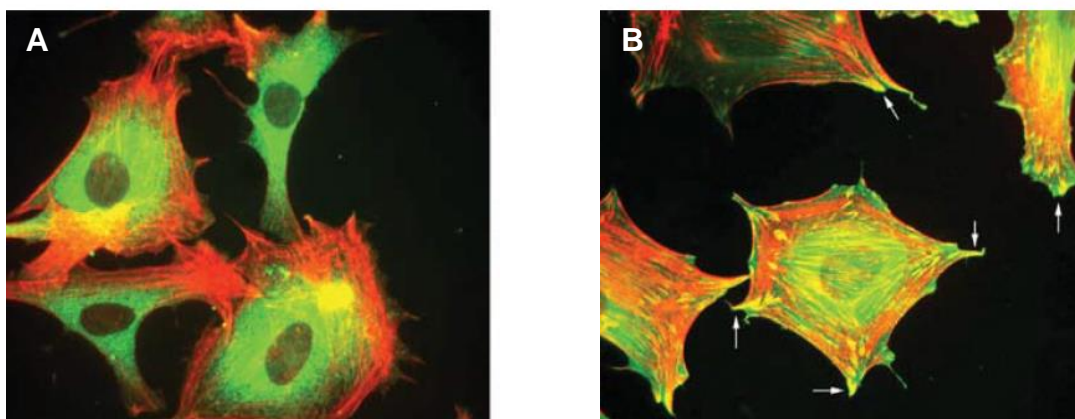


Figure 25 : Importance des chaînes HS du syndécan-4 dans la formation des plaques d'adhérence. (A) Fibroblastes en contact de *coverslips* couvertes du domaine de liaison à l'intégrine de la fibronectine. (B) Les points d'adhérence focale (indiqués par les flèches blanches) sont formés à la suite de l'ajout du domaine de la fibronectine responsable de la liaison à l'héparine. Données provenant de Okina *et al.*, 2009.

E. Implication des HS dans l'endocytose

Même si la fonction des HSPG dans l'endocytose de complexes récepteur/ligand a dans un premier temps été controversée, leur implication dans ce processus est aujourd'hui clairement établie (Figure 22F). En effet, ils n'interviennent pas uniquement dans le changement de conformation du ligand pour le présenter à son récepteur, mais entraînent avec eux les complexes ligand/récepteur lorsqu'ils sont endocytés pour être recyclés (Christianson *et al.*, 2014). De plus, les HS sont capables d'endocyter des ligands de manière indépendante et ne sont pas seulement une partie d'un complexe macromoléculaire ou un point d'attachement initial entraînant l'endocytose (Wittrup *et al.*, 2009). Plusieurs ligands des HS sont ainsi internalisés, tels que le FGF-2, l'AT-III, le complexe follistatine/activine, la thrombospondine, la lipoprotéine lipase, des polypeptides cationiques, des anticorps reconnaissant les HS mais également certains LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Bernfield *et al.*, 1999 ; McArthur *et al.*, 2007 ; Stanford *et al.*, 2010). D'ailleurs, le rôle des HS dans

l'endocytose est particulièrement important dans le métabolisme lipidique puisqu'ils permettent la clairance des lipoprotéines. En effet, des souris n'exprimant pas le syndécan-1 accumulent des lipoprotéines contenant des triglycérides provenant du foie mais également de l'alimentation. L'inactivation de sulfotransférases modifiant les HS conduit aux mêmes phénotypes, montrant que la sulfatation des HS est nécessaire à la liaison des lipoprotéines (MacArthur *et al.*, 2007 ; Stanford *et al.*, 2010). Enfin, en plus de permettre l'internalisation de nombreux ligands protéiques et lipoprotéiques, les HS sulfatés sont impliqués dans le trafic des exosomes comme le montre la diminution de l'internalisation de ces vésicules par les cellules dépourvues de HS ou bien portant des HS non sulfatés (Christianson *et al.*, 2013).

L'internalisation de protéines *via* les HSPGs peut être régulée à différents niveaux. Des études montrent que les petites protéines G RhoA, RhoG, ARF6, cdc42 et Rac1, qui sont impliquées dans différentes voies d'endocytose comme la formation des vésicules à clathrine, à cavéoline, ou bien l'internalisation *via* les radeaux lipidiques, sont capables de moduler l'endocytose induite par les HS (Zimmermann *et al.*, 2005 ; Bass *et al.*, 2007 ; Payne *et al.*, 2007). L'internalisation *via* les HSPGs n'est donc pas spécifique d'une seule voie et peut dépendre du contexte cellulaire et du ligand. Le *shedding* des HSPGs entraîne aussi une régulation de l'endocytose. En effet, les syndécans mais aussi les glypicans peuvent être coupés par diverses enzymes, entraînant la séquestration de ligands des HS à l'extérieur des cellules (Nam & Park., 2012). Cependant, la manière dont la cellule régule la synthèse et la localisation des HSPGs nécessaires à l'internalisation de ligands environnant reste peu comprise.

Les HS sont également impliqués dans un cas particulier d'endocytose faisant partie d'un mécanisme de régulation de l'activité des chimiokines appelé transcytose. La transcytose est mise en œuvre notamment dans le cadre du transport des chimiokines depuis la membrane basale des cellules endothéliales vers leur face luminale. Cette notion a été démontrée pour la première fois par Middleton *et al.* en 1997. Après injection sous-cutanée de CXCL8 sauvage ou bien d'une forme tronquée dans le domaine C-terminal qui contient son domaine de liaison à l'héparine, les auteurs ont observé par microscopie électronique que la forme tronquée était à peine détectable au niveau de la face luminale des cellules endothéliales, suggérant donc que la transcytose de CXCL8 dépendait de son domaine de liaison à l'héparine. Une étude plus récente a confirmé ces données en montrant que l'inactivation de la NDST1, conduisant à la présence d'HS très peu sulfatés en surface des cellules, entraînait une diminution de la transcytose des chimiokines (Wang *et al.*, 2005).

F. Organisation des matrices extracellulaires

Les HS peuvent être situés à la membrane plasmique mais aussi à l'extérieur des cellules et ainsi participer à la formation des MEC (Figure 22G). Les tissus épithéliaux s'appuient sur

des matrices appelées membranes basales, qui sont des matrices particulières (Bishop *et al.*, 2007). Ces matrices présentent des propriétés mécaniques de résistance au stress, et sont composées d'agrines, de perlécans et de collagène XVIII qui sont des HSPGs, mais aussi de molécules capables d'interagir avec les HS que sont les collagènes, les laminines et les fibronectines (Groffen *et al.*, 1998 ; Arikawa-Hirasawa *et al.*, 1999 ; Ghallager, 2015). La fibronectine monomérique présente trois domaines de liaison aux HS : un domaine Hep1 de faible spécificité et faible affinité situé dans la région N-terminale, un domaine HepII de haute affinité qui est le domaine d'interaction principal, et un troisième domaine dans une zone qui peut subir un épissage alternatif (Sharma *et al.*, 1999 ; Schwarzbauer & DeSimone, 2011). Les laminines possèdent différents domaines d'interaction avec les HS (Utani *et al.*, 2001 ; Matsuura *et al.*, 2004), de même que les fibrilles de collagène (San Antonio *et al.*, 1994 ; Vaughan-Thomas *et al.*, 2001 ; Peng *et al.*, 2018). Les interactions des HS avec ces molécules sont essentielles pour l'établissement des propriétés de la MEC. Par exemple, la liaison des HS à la fibronectine induit des changements conformationnels. Elle passe alors d'une forme globulaire à une forme plus étendue (Figure 26), ce qui favorise sa liaison aux intégrines et son intégration dans la MEC (Ghallager, 2015). De plus, les interactions entre les HS et les collagènes influencent la taille et la forme des fibrilles. Les HS participent donc à la fondation de la MEC et contribuent à définir leur forme (Sweeney *et al.*, 1998).

La MEC a aussi une fonction de réservoir des facteurs de croissance, morphogènes, chimiokines ou autres cytokines, dans laquelle les HS sont impliqués (Sarrazin *et al.*, 2011) (Figure 22H). En participant à l'immobilisation de ces facteurs, ils permettent d'éviter leur dégradation mais aussi leur diffusion. Par exemple, ils interviennent dans la fixation du VEGF dans les matrices. En effet, le traitement d'une MEC avec de l'héparine augmente la liaison du facteur de croissance à son récepteur (Mitsi *et al.*, 2006). Au niveau moléculaire, ils jouent un rôle dans la mise en place des interactions entre la fibronectine et les facteurs de croissance comme le VEGF. Le changement de conformation de la fibronectine induit par l'interaction avec les HS permet de libérer des sites de fixation aux facteurs de croissance. Cependant, pour que les sites de liaisons au VEGF soient libérés, l'interaction nécessite *in vitro* des fragments d'héparine d'au moins 22 saccharides sulfatés en position 6 de la glucosamine et sur la fonction amine (Mitsi *et al.*, 2006 ; Mitsi *et al.*, 2008). Ils sont aussi impliqués dans la fixation du PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) à la fibronectine selon un mécanisme similaire (Smith *et al.*, 2009 ; Symes *et al.*, 2010). D'autre part, il a été montré que les HS portés par le collagène XVIII étaient impliqués dans l'immobilisation de la lipoprotéine lipase au niveau de la membrane basale des cellules endothéliales, étape indispensable à sa présentation au niveau de la lumière des vaisseaux. En effet, des souris déficientes en

collagène XVIII présentent des niveaux réduits de lipoprotéines lipase dans le sang, ainsi qu'une hypertriglycéridémie (Bishop *et al.*, 2011).

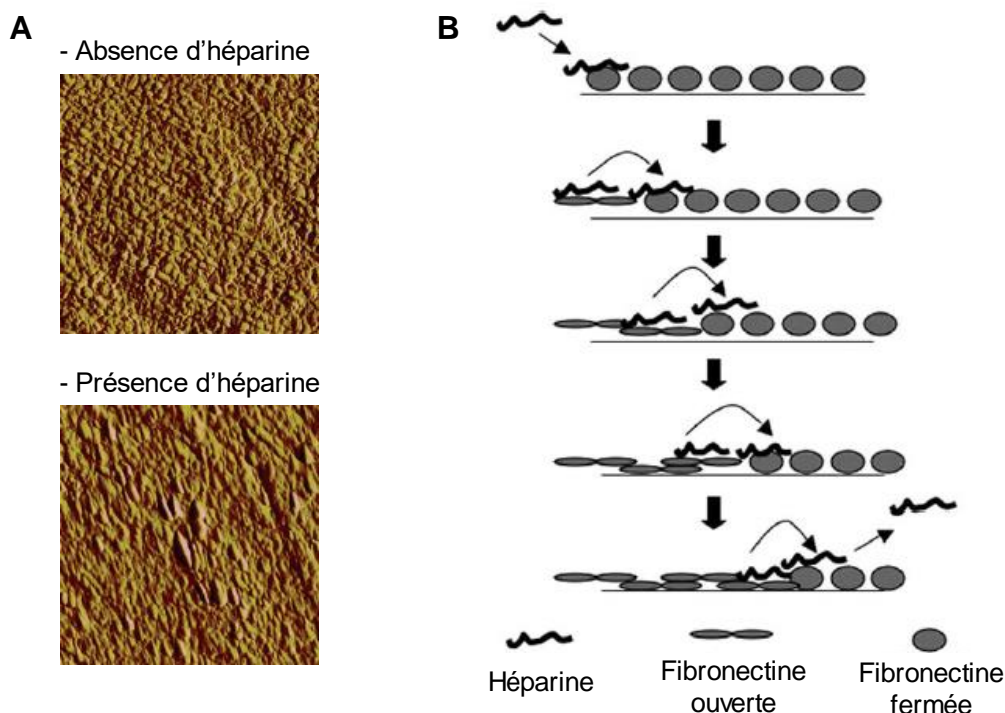


Figure 26 : Changement de conformation de la fibronectine induit par l'interaction avec l'héparine. (A) Une solution de fibronectine humaine a été incubée pendant une nuit sur du polystyrène en présence ou en absence de 1 µg/mL d'héparine. Les supports ont alors été observés par microscopie de force atomique. Lorsque l'incubation est réalisée en absence d'héparine, les protéines forment de gros agrégats désorganisés, tandis que lorsqu'elle a été réalisée en présence d'héparine, la couche protéique qui recouvre le polystyrène est beaucoup plus organisée et les agrégats semblent plus longilignes. D'après Mitsi *et al.*, 2006. (B) Mécanisme d'interaction proposé. Lorsque la fibronectine est en conformation ouverte, son affinité pour l'héparine diminue très largement ce qui mène à la rupture des interactions. D'après Mitsi *et al.*, 2008.

Enfin, les HS présents dans les matrices extracellulaires interviennent dans la régulation du transport de facteurs en jouant un rôle de filtre. Il existe une membrane basale particulière au niveau du système urinaire appelée membrane basale glomérulaire. Elle est située entre l'endothélium et les cellules spécifiques du rein appelées podocytes. Les chaînes HS anioniques présentes dans cette membrane empêchent le passage de substances sanguines chargées négativement dans les reins, comme certaines protéines (Raats *et al.*, 2000). En effet, la perfusion d'héparinase au niveau des reins chez le rat entraîne une augmentation de la concentration en protéines dans l'urine (Kanwar *et al.*, 1980). Les mêmes résultats sont observés chez des souris transgéniques dont les cellules rénales surexpriment l'héparinase (Zcharia *et al.*, 2004).

G. Le côté obscur des HS

Un composant impliqué dans d'aussi nombreuses fonctions est forcément source de convoitise. Ce fut le cas pour la Force, comme l'ont prouvé les multiples batailles opposant les

sympathisants de la République aux partisans de l'Empire pour en obtenir le contrôle, lors d'une sombre période appelée aujourd'hui « La Guerre des étoiles » (Lucas, 1977). C'est aussi le cas des HS. Ainsi, bien qu'étant indispensables à la mise en place de très nombreux et divers processus physiologiques, les HS sont également acteurs lors de mécanismes infectieux. Par exemple, une majorité de microorganismes est suspectée d'interagir avec les HS des cellules hôtes pour les infecter (Bernfield *et al.*, 1999). C'est notamment le cas de bactéries telles que *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* ou *Helicobacter pylori*, de parasites comme *Plasmodium falciparum* ou *Trypanosoma cruzi*, mais aussi de virus tels que le HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), le virus de l'herpès HSV-1, le cytomégalovirus, le virus de la vaccine, ou le papillomavirus, entre autres (Frevert *et al.*, 1993 ; Bernfield *et al.*, 1999 ; Spillmann, 2001 ; Vivès *et al.*, 2006 ; Becker *et al.*, 2018). Pour autant, l'interaction avec les HS n'est pas forcément indispensable à l'infection comme c'est le cas pour le *Pseudorabies virus* (Karger *et al.*, 1995). Les travaux menés sur le rôle des HS dans la modulation de l'infection par les microorganismes ne font généralement pas la distinction entre les différentes étapes de l'infection que sont la liaison, la réplication et l'invasion : il est possible que les HS interviennent à différents niveaux. En ce sens, il a été montré que des cellules déficientes en HS étaient tout de même infectées par *Toxoplasma gondii*, ce qui indique que les HS n'interviennent pas dans la liaison à la membrane. Cependant, la réplication du microorganisme était diminuée dans ce modèle (Bishop *et al.*, 2005). Les HS pourraient donc réguler des événements de signalisation intervenant après l'infection en plus de permettre la liaison des microorganismes à la membrane des cellules hôtes.

Les HS peuvent également être impliqués dans la virulence des bactéries, comme c'est le cas pour *Pseudomonas aeruginosa*. En cas de blessure du poumon, le syndécan-1 exprimé par l'épithélium alvéolaire peut subir un *shedding* pour réguler la concentration en chimiokines et donc la migration des neutrophiles (Li *et al.*, 2002). Plusieurs travaux montrent que la bactérie détourne ce processus à son bénéfice : *Pseudomonas aeruginosa* stimule le *shedding* du syndécan-1, et l'ectodomaine coupé augmente son taux d'infection *in vivo*. En effet, des souris déficientes en syndécan-1 sont résistantes à l'infection par cette bactérie. Le rôle des HS a été suggéré par le fait que ces souris deviennent sensibles à cette infection bactérienne en présence d'héparine (Park *et al.*, 2001 ; Haynes *et al.*, 2005). Il semble toutefois que les HS n'agissent pas directement sur la bactérie, puisqu'une pré-incubation des bactéries avec de l'héparine n'augmente pas le taux d'infection. Il a alors été proposé qu'ils pouvaient être impliqués dans une inhibition des défenses de l'organisme hôte (Park *et al.*, 2001). D'autres bactéries seraient également capables d'utiliser ce mécanisme. En effet, *Staphylococcus aureus* pourrait agir de la même façon, d'une manière strictement dépendante du syndécan-1, en stimulant aussi son *shedding* (Park *et al.*, 2000).

Les HS sont impliqués dans d'autres types de pathologies tels que les tauopathies, comme la maladie d'Alzheimer. Les tauopathies sont caractérisées par une hyperphosphorylation de la protéine Tau, qui peut alors s'agréger. Ceci entraîne la déstabilisation des microtubules au niveau cellulaire, et donc la dégénérescence neurofibrillaire menant, à terme, à la mort du neurone (Sepulveda-Diaz *et al.*, 2015). La maladie d'Alzheimer est aussi définie par l'accumulation du peptide A β (Amyloïde- β). Les HS favoriseraient également la formation des plaques amyloïdes en permettant la formation de fibrilles insolubles et en les protégeant de la dégradation (Zhang *et al.*, 2014). Les effets des HS dans ce processus dépendraient de leur état de sulfatation : la fibrillogénèse est favorisée lorsque les HS sont très sulfatés, et inversement (Castillo *et al.*, 1999). En outre, la surexpression de l'héparanase chez des souris entraîne une diminution très importante de la formation de ces plaques (Li *et al.*, 2005).

Enfin, les HS sont également impliqués dans les processus cancéreux, ce qui est détaillé en Partie 4.

PARTIE 4 : IMPLICATIONS DES HEPARANES SULFATES DANS LES PROCESSUS CANCEREUX

Les HS, par leurs capacités d'interaction avec des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des cytokines ou des molécules de la matrice extracellulaire, sont des modulateurs des propriétés des cellules cancéreuses telles que la prolifération, la survie, la migration et l'adhérence. La structure des HS des cellules cancéreuses est différente de celle des HS présentés par les tissus sains. Ceci suggère que les capacités d'interaction des HS des cellules cancéreuses, et par conséquent, leurs fonctions, sont modifiées. Ils peuvent donc être directement impliqués dans le développement des cellules cancéreuses et la progression tumorale. Cela étant, il est aussi envisageable de rechercher des thérapies anticancéreuses qui s'appuient sur ces propriétés (Afratis *et al.*, 2012 ; Nagarajan *et al.*, 2018).

I. Rôles des HS dans la progression tumorale

A. Les HS des cellules cancéreuses

1. Mécanismes de régulation

La cancérisation implique un important remodelage des mécanismes de régulation aussi bien génétique qu'épigénétique, ce qui conduit à une modification du protéome cellulaire (Sasisekharan *et al.*, 2002). Au niveau génétique, c'est l'intégrité des gènes qui est atteinte. Les gènes codant les protéoglycanes ou ceux codant les enzymes de biosynthèse des HS peuvent être affectés par diverses mutations. Lorsqu'elles existent, ces mutations, sans forcément mener à une variation des niveaux d'expression, peuvent conduire à la production d'une forme peu active voire totalement inactive de la protéine concernée. Cependant, bien que ces mécanismes soient inhérents à la transformation maligne, un nombre restreint de mutations atteignant les gènes codant les enzymes de biosynthèse des HS ou les HSPGs a été décrit chez les cellules cancéreuses. Par exemple, une mutation dans le gène codant le glypican-5 observée chez des cellules de cancer des ovaires altère la formation d'un dimère de cystéine, ce qui a un impact négatif sur le repliement de la protéine et donc sur ses interactions. Des mutations dans les gènes codant EXT2, NDST2 et NDST4 ont également été retrouvées chez des cellules cancéreuses (Yoneda *et al.*, 2012). L'expression des protéoglycanes et des enzymes de biosynthèse des HS peut plus largement être modifiée par des phénomènes épigénétiques lors de la transformation maligne. Certains gènes qui ne s'exprimaient pas vont pouvoir être transcrits puis traduits quand l'expression d'autres gènes s'éteint (Hull *et al.*, 2017). Ces modifications affectent l'expression des HSPGs et des enzymes de biosynthèse des HS et sont à l'origine des différences de structure observées entre les HS des cellules saines et ceux des cellules cancéreuses.

A ces deux types de dérégulation engendrés par la cancérisation s'ajoute un troisième niveau de modification qui dépend cette fois du microenvironnement tumoral. Les facteurs solubles, qu'ils soient produits par les cellules cancéreuses ou bien par les leucocytes infiltrés, peuvent faire varier l'expression des HSPGs et celle des enzymes de biosynthèse des HS. En ce sens, il a été observé que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α et IFN- γ modifiaient la quantité de HS produits par les cellules endothéliales (Klein *et al.*, 1992). En outre, l'environnement des cellules cancéreuses varie en fonction de l'état d'avancement de la maladie, ce qui entraîne une production variable de cytokines et de facteurs de croissance (Balkwill & Mantovani, 2012). La structure des HS et leurs propriétés sont donc potentiellement sujettes à des modifications dépendantes de la progression tumorale et du type de cancer. Par exemple, les niveaux d'expression des enzymes de biosynthèse des HS ont été analysés *in vitro* chez des cellules cancéreuses à différents stades (Suhovskih *et al.*, 2015). Il a été observé que des lignées de cellules cancéreuses épithéliales peu agressives possèdent une machinerie de biosynthèse plutôt prévue pour l'élongation des chaînes, puisqu'elles expriment des taux plus importants de polymérase EXT1 et EXT2. A l'opposé, des lignées de cellules cancéreuses agressives et métastatiques expriment majoritairement les NDST1, NDST2 et les sulfatases, des enzymes impliquées dans la maturation des HS.

2. Modifications de l'expression des protéoglycanes et des enzymes de biosynthèse des HS

Etant donné que les niveaux d'expression des protéoglycanes sont modifiés chez les cellules cancéreuses, il a été proposé qu'ils puissent être utilisés comme marqueurs de certains types de cancer (Hull *et al.*, 2017). Cependant, la manière dont les niveaux d'expression de ces molécules impactent la croissance des cellules cancéreuses varie en fonction du type de cancer. Par exemple, l'expression du syndécan-1 est augmentée dans les cancers du côlon, de la prostate, de l'estomac, de l'utérus, du pancréas, des ovaires, du larynx, du sein et dans les lymphomes, ce qui est de mauvais pronostic quant à la survie des patients (Yip *et al.*, 2006). En revanche, il a été montré qu'une perte de l'expression du syndécan-1 était associée à une augmentation de la progression tumorale et donc était de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer colorectal, du poumon, et de la tête et du cou (Couchman *et al.*, 2015). L'expression du syndécan-4 est également diminuée dans les cancers colorectaux, quand celle du syndécan-2 est augmentée (Vicente *et al.*, 2018). Concernant les glypicans, l'expression du glypican-1 a été retrouvée augmentée dans des cellules tumorales prélevées de patientes atteintes de cancer du sein par rapport à des cellules mammaires saines provenant des mêmes patientes (Matsuda *et al.*, 2001). Les niveaux d'expression du glypican-3 sont variables et dépendent du type de cancer. La diminution de son expression, due à une hyperméthylation de son promoteur, est de mauvais pronostic dans le cas de cancers urothéliaux (Aydin *et al.*,

2015). Cependant, il est surexprimé dans le cas de carcinomes hépatocellulaires (Wu *et al.*, 2016 ; Montalbano *et al.*, 2017). L'expression du glypican-5 est aussi augmentée dans des biopsies de patients atteints de rhabdomyosarcomes et de lymphomes (Yu *et al.*, 2003 ; Williamson *et al.*, 2007), tandis qu'elle est diminuée dans les métastases ganglionnaires et le cancer du sein (Zhang *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2016). L'absence de l'expression du glypican-5 pourrait même être un facteur de prédisposition au cancer du sein (Zhang *et al.*, 2011). Alors que le CD44v3 n'est que très peu exprimé par les cellules épithéliales saines, son expression est élevée chez des cellules de cancer colorectal prélevées chez des patients (Wielanga *et al.*, 2000). Finalement, l'expression du bétaglycan dans les cancers est variable mais très souvent diminuée (Bernabeu *et al.*, 2009). (Les variations d'expression des protéoglycanes lors des cancers sont résumées dans le tableau 5).

L'expression des enzymes de biosynthèse des HS est aussi largement modifiée chez les cellules cancéreuses. Leurs niveaux d'expression ne sont pas tous augmentés ou diminués, mais varient selon l'enzyme et le type de cancer. Il a été montré que les enzymes impliquées dans la formation du tétrasaccharide pouvaient être surexprimées dans différents types de cancer comme c'est le cas de la B3GalT6 dans le cancer du côlon (Lo Sasso *et al.*, 2013). De plus, l'expression des enzymes impliquées dans l'élongation est modifiée. En ce sens, les polymérases EXT sont sous exprimées dans les cellules métastatiques de chondrosarcomes tandis que leurs niveaux d'expression ne varient pas dans la tumeur centrale (Schrage *et al.*, 2009). L'expression de EXTL3 est également diminuée dans le cancer du côlon en raison d'une méthylation de son promoteur (Karibe *et al.*, 2008). Les niveaux d'expression des enzymes impliquées dans la maturation des HS sont aussi impactés. Dans le cas des NDSTs, les variations d'expression sont variées et dépendent de l'isoenzyme et du type de cancer. L'expression de la NDST1 est diminuée lors de cancers de l'estomac (Shi *et al.*, 2011). Celle de la NDST4 diffère selon les types de cancer. Alors qu'elle est augmentée chez des cellules de cancer du sein (Fernandez-Vega *et al.*, 2013), elle est diminuée chez des cellules de cancer colorectal (Tzeng *et al.*, 2013). De même, les variations d'expression des enzymes modifiant les acides uroniques ne sont pas homogènes : l'expression de la C5-épimérase diminue dans les cancers du sein et du poumon (Prudnikova *et al.*, 2010 ; Grigorieva *et al.*, 2011) tandis que HS2ST est surexprimée dans les cancers de la prostate (Ferguson *et al.*, 2011). Les HS6STs sont aussi surexprimées dans différents types de cancer (Hatabe *et al.*, 2013 ; Cole *et al.*, 2014 ; Iravani *et al.*, 2017), alors que l'expression des Sulfs varie à la hausse ou à la baisse en fonction des types de cancers (Vivès *et al.*, 2014). Les variations d'expression des HS3STs lors des cancers seront abordées dans la partie 5. Finalement, les niveaux d'expression des héparanases varient aussi largement. L'héparanase-1, une enzyme qui clive les chaînes HS grâce à son activité endo- β -D-glucuronidase, est très souvent surexprimée dans de nombreux

types de cancer. De ce fait, elle est associée à la progression tumorale en impactant plusieurs processus. L'héparanase-2 est un homologue de l'héparanase-1 auquel il manque l'activité enzymatique, qui agit comme un inhibiteur de l'héparanase-1. Son expression est plutôt diminuée dans les cancers (Vlodavsky *et al.*, 2018). (Les modifications d'expression des enzymes de biosynthèse des HS sont résumées dans le tableau 6).

Tableau 5 : Variations de l'expression des HSPGs dans les cancers

Enzyme	L'expression est...	Type de cancer
Syndécan-1	Augmentée	Cancer du côlon Cancer de la prostate Cancer de l'estomac Cancer de l'utérus Cancer du pancréas Cancer des ovaires Cancer du larynx Lymphomes Cancer du sein
	Diminuée	Cancer colorectal Cancer du poumon Cancer de la tête et du cou
Syndécan-2	Augmentée	Cancer colorectal
Syndécan-4	Diminuée	Cancer colorectal
Glypican-1	Augmentée	Cancer du sein
Glypican-3	Augmentée	Carcinomes hépatocellulaires
	Diminuée	Cancer urothélial
Glypican-5	Augmentée	Lymphomes Rhabdosarcomes
	Diminuée	Métastases ganglionnaires Cancer du sein
CD44v3	Augmentée	Cancer colorectal
Bétaglycan	Augmentée	Lymphomes non hodgkiniens Leucémies lymphocytiques chroniques
	Diminuée	Neuroblastomes Carcinomes ovariens Carcinomes endométriaux Carcinomes de la prostate Carcinomes du sein Carcinomes du rein Carcinomes du poumon à non petites cellules Carcinomes pancréatiques

Tableau 6 : Variations de l'expression des enzymes de modification des HS dans les cancers

Enzyme	L'expression est...	Type de cancer
B3GalT6	Augmentée	Cancer du côlon
EXT1/2	Variée	Ostéochondrome Chondrosarcomes périphériques
EXTL3	Diminuée	Cancer colorectal
NDST1	Diminuée	Cancer de l'estomac
NDST4	Augmentée	Cancer du sein
	Diminuée	Cancer colorectal
C5-épimérase	Diminuée	Cancer du sein Cancer du poumon
HS2ST	Augmentée	Cancer de la prostate
HS6ST1-3	Augmentée	Cancer colorectal Cancer des ovaires Cancer du sein
Sulf1/2	Variée	Nombreux types de cancer
Héparanase-1	Augmentée	Nombreux types de cancer
Héparanase-2	Diminuée	Nombreux types de cancer

B. HS et prolifération cellulaire

Les modifications de l'expression des enzymes de biosynthèse des HS entraînent une profonde altération de leur structure. Les fonctions des HS dépendant de leur structure, ce système est à l'origine d'une modification importante de leurs propriétés vis-à-vis des cellules cancéreuses (Raman *et al.*, 2010). Ainsi, les capacités d'interaction des HS des cellules cancéreuses avec les facteurs de croissance tels que les FGFs, le PDGF, le HB-EGF et le HGF sont améliorées (Knelson *et al.*, 2014). Cependant, il reste à déterminer si les changements dans les niveaux d'expression des enzymes de biosynthèse des HS ont lieu en réponse aux besoins accrus des cellules cancéreuses pour assurer leur prolifération et leur survie, ou si, à l'inverse, ces changements d'expression intervenus pendant la tumorigenèse favorisent ensuite la croissance des cellules tumorales.

Cela étant, il a été montré que l'expression du glypican-3 dans le cas de carcinomes hépatocellulaires était associée à une augmentation de la prolifération cellulaire *via* la signalisation induite par les IGFs (*Insulin-like Growth Factor*) (Cheng *et al.*, 2008). Des niveaux d'expression plus importants du glypican-1 et du syndécan-1 chez des cellules de cancer du sein sont associés à une augmentation de la prolifération en réponse à des stimulations avec le FGF-2, le HB-EGF et le HGF. De manière intéressante, l'invalidation de l'expression du glypican-1 conduit à une diminution de la signalisation associée au HB-EGF quand l'invalidation de l'expression du syndécan-1 n'a pas cet effet (Matsuda *et al.*, 2001). Ces résultats soulignent

le fait que la surexpression des protéoglycanes chez les cellules cancéreuses peut avoir des effets non redondants, étant associée à des évènements spécifiques de signalisation. Les mêmes effets associés au glypican-1 sont retrouvés dans des cellules de cancer du pancréas et de gliomes (Iozzo & Sanderson, 2011). L'invalidation de l'expression de ce protéoglycane entraîne une importante diminution de la prolifération *in vitro* et conduit à la formation de tumeurs plus petites lorsque des cellules de cancer du pancréas sont injectées chez des souris (Aikawa *et al.*, 2008). Quant au syndécan-1, son invalidation d'expression chez des cellules de cancer de la prostate ou des myélomes entraîne leur apoptose en plus d'inhiber leur prolifération (Khotskaya *et al.*, 2009 ; Fujii *et al.*, 2015). Finalement, l'invalidation de l'expression du glypican-5 dans des cellules de rhabdosarcomes conduit à une inhibition de la prolifération (Williamson *et al.*, 2007).

L'héparanase-1 produite par les cellules cancéreuses favorise la prolifération cellulaire en induisant l'expression de plusieurs facteurs de croissance et en augmentant leurs effets. Elle entraîne l'expression du VEGF selon une voie dépendante des SFK (*Src Family Kinases*) chez plusieurs types de cellules cancéreuses (Zetser *et al.*, 2006). De manière surprenante, il a été montré que l'héparanase-1 pouvait induire l'expression du HGF chez des cellules de mélanome mais indépendamment de son activité enzymatique (Ramani *et al.*, 2011). De même, elle peut induire l'activation de l'EGFR, de Src et de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription protein*) grâce à son domaine C-terminal, toujours de manière indépendante de son action endoglycosidase, et augmente ainsi la prolifération de cellules de cancer de la tête et du cou (Cohen-Kaplan *et al.*, 2011).

Les HSPGs du microenvironnement tumoral peuvent également avoir un effet sur la prolifération des cellules cancéreuses. (Whitelock & Iozzo, 2005). Par exemple, il a été observé que l'expression du syndécan-1 par les fibroblastes présents dans le stroma de tissus néoplasiques était augmentée dans plus de 70% des cancers du sein, mais aussi dans le cas de cancers de la thyroïde, de la tête et du cou, et de cancer gastrique (Wiksten *et al.*, 2001 ; Ito *et al.*, 2003 ; Mukunyadzi *et al.*, 2003 ; Mennerich *et al.*, 2004). Ainsi, Maeda *et al.* (2006) ont montré que la présence de fibroblastes surexprimant le syndécan-1 augmentait de manière importante la prolifération des cellules tumorales MDA-MB-231 après inoculation chez des souris. De plus, le syndécan-1 stromal peut subir un *shedding*. L'accumulation du domaine extracellulaire clivé permet la libération de facteurs de croissance et a aussi été associé à une augmentation de la prolifération cellulaire dans le cas de myélomes (Bayer-Garner *et al.*, 2001). Cet effet est d'ailleurs renforcé par l'héparanase, produite par les cellules tumorales, puisque la présence de cette enzyme favorise l'expression du syndécan-1 et son *shedding* dans le cas de cancers du sein et de myélomes (Yang *et al.*, 2007).

C. HS et angiogenèse

C'est en 1971 que Folkman *et al.* ont suggéré les premiers qu'il pouvait exister une relation entre l'angiogenèse et la croissance tumorale. En effet, pour se développer, les tumeurs nécessitent un apport vasculaire adapté. L'angiogenèse, qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est donc un mécanisme nécessaire à la croissance tumorale. L'angiogenèse devient d'ailleurs indispensable lorsque la taille des tumeurs dépasse 1 à 2 mm de diamètre, puisque la diffusion des nutriments n'est plus assez efficace pour assurer la croissance des cellules (Tímar *et al.*, 2001). Grâce à leurs capacités d'interactions avec des facteurs qui affectent profondément l'angiogenèse tels que les VEGFs, le PDGF, les FGFs, le HGF et le TGF- β , les HS participent largement à la formation de nouveaux vaisseaux en conditions physiologiques mais aussi dans le cadre de cancers (Iozzo & San Antonio, 2001 ; van Wijk & van Kuppevelt, 2014).

Le syndécan-1 est connu pour avoir un rôle prépondérant dans l'angiogenèse chez les cellules cancéreuses. Pour intervenir dans la régulation de l'angiogenèse, cet HSPG établit des interactions avec les intégrines $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$ présentes à la surface de cellules cancéreuses. Il a été montré que l'injection chez des souris de cellules de cancer du sein exprimant le syndécan-1 traitées avec de la synstatine, un peptide inhibiteur du syndécan-1, conduisait à la formation de tumeurs dont la vascularisation était nettement diminuée (Beauvais *et al.*, 2009). De plus, les niveaux d'expression du syndécan-1 sont augmentés dans des biopsies de patients atteints de carcinome colorectal en même temps que ceux de marqueurs de l'angiogenèse tels que le VEGF et la ténascine, une protéine présente dans la MEC (Mitselou *et al.*, 2012). Il existe aussi une corrélation positive entre les niveaux d'expression du syndécan-1 par les cellules du micro-environnement tumoral et la densité en vaisseaux sanguins des tumeurs chez des patients atteints de myélomes multiples (Andersen *et al.*, 2014).

D'autre part, les HSPGs étant des composants majeurs de la MEC, ils participent à la filtration des fluides biologiques et modulent alors la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Nikitovic *et al.*, 2013). Ainsi, il a été montré que l'injection de cellules de carcinomes du côlon chez des souris chez lesquelles l'expression du perlécan avait été invalidée conduisait à la formation de tumeurs nettement moins vascularisées que celles observées après injection chez des souris contrôles (Sharma *et al.*, 1998).

L'héparanase peut également intervenir dans la régulation de l'angiogenèse. Son expression a été associée à l'apparition de nouveaux vaisseaux. En outre, l'inoculation de cellules de lymphome surexprimant l'héparanase chez des souris conduit à une augmentation de la vascularisation des tumeurs (Elkin *et al.*, 2001). Une étape requise pour la formation de nouveaux vaisseaux est la dégradation des structures existantes. Grâce à son activité endo- β -

D-glucuronidase, l'héparanase facilite la déstructuration de la MEC pour la mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins (Vlodavsky & Friedman, 2001). Par ailleurs, l'activité de l'héparanase conduit à la libération de HS bioactifs liés à des facteurs pro-angiogéniques. Cette notion a été démontrée *in vivo* par Roy & Marchetti en 2009. Dans un premier temps, des cellules cancéreuses ont été traitées *in vitro* avec de l'héparanase, puis les HS de surface libérés ont été isolés. Les auteurs ont alors injecté chez des souris des cellules de mélanomes qui avaient été mises en présence ou non de ces HS préalablement isolés. Ils ont observé qu'il y avait significativement plus de vaisseaux sanguins dans les néoplasmes obtenus à partir de cellules stimulées avec les HS isolés. De plus, il a été montré que le VEGF conduisait à une augmentation de l'expression de l'héparanase dans les mélanomes et réciproquement, suggérant que l'enzyme et le facteur pro-angiogénique régulent mutuellement leur activité (Luan *et al.*, 2011).

D. HS et formation des métastases

Les métastases sont des cellules issues d'une tumeur dite primaire qui se sont disséminées *via* les circulations sanguine ou lymphatique dans différents tissus de l'organisme pour former d'autres tumeurs alors qualifiées de tumeurs secondaires. La formation des métastases est un processus qui se déroule en plusieurs étapes au cours duquel les cellules tumorales doivent envahir les tissus environnants pour ensuite pénétrer dans les circulations, y survivre et en sortir pour pouvoir coloniser de nouveaux tissus (Figure 27). Les modifications de glycosylation qui interviennent lors de la transformation maligne jouent un rôle essentiel dans le processus de formation des métastases, puisque les glycanes sont impliqués dans la modulation des interactions des cellules cancéreuses avec leur environnement (Haüselmann & Borsig, 2014). Les HS pouvant établir des interactions avec des facteurs de croissances favorisant la formation des métastases tels que le FGF-2, l'HB-EGF, le VEGF et l'HGF, ils sont impliqués dans différentes étapes de ce processus. De plus, ils régulent des mécanismes de régulation pro-métastatiques. Par exemple, le CD44 peut lier le HGF *via* ses chaînes HS, et il a été montré qu'il pouvait favoriser l'expression et la sécrétion de ce facteur (Williams *et al.*, 2013).

Pour pouvoir former des métastases, les cellules doivent donc acquérir de nouvelles capacités de migration et d'invasion qui leur permettent de rompre les liaisons formées avec les tissus d'origine, de dégrader les matrices extracellulaires, d'entrer dans les systèmes de circulation mais aussi d'en sortir pour se développer et proliférer dans de nouveaux tissus. Une caractéristique déterminante des cellules épithéliales cancéreuses dans la formation des métastases est la capacité de réaliser la TEM (Transition Epithélio-Mésenchymateuse). Il s'agit d'un processus originellement physiologique qui intervient lors de différentes étapes du développement embryonnaire, et qui peut être activé de manière aberrante dans les cancers.

La TEM correspond à une transdifférenciation de cellules épithéliales. Elles perdent leurs caractéristiques définies par une polarité baso-apicale, l'établissement de jonctions serrées et adhérentes et une faible motilité, au profit de caractéristiques de cellules mésenchymateuses qui présentent une polarité avant-arrière, qui sont beaucoup plus mobiles, qui sécrètent des enzymes de dégradation, et qui n'entrent pas en sénescence (Davis *et al.*, 2014).

Grâce à leurs capacités d'interaction avec des facteurs favorisant la TEM tels que le HGF, le VEGF et le TGF- β , les HS et les HSPGs sont impliqués dans sa mise en place chez les cellules tumorales (Knelson *et al.*, 2014). Par exemple, il a été montré que le syndécan-1 induisait la TEM chez des cellules de cancer de la prostate en favorisant la synthèse du micro-ARN miR-331-3p (Fujii *et al.*, 2015). L'expression du glypican-3 a aussi été associée à celle de marqueurs de la TEM dans des biopsies prélevées chez des patients atteints de carcinomes hépatocellulaires, bien que le mécanisme sous-jacent soit inconnu (Wu *et al.*, 2015). Par ailleurs, pour sortir des circulations sanguine ou lymphatique et se développer dans de nouveaux tissus, les cellules cancéreuses doivent réaliser le processus inverse appelé TME (Transition Mésenchymo-Epithéliale). Peu d'études ont analysé l'implication des HS dans la TME. Toutefois, il a été montré que le glypican-3 induisait une TME chez des cellules de cancer du sein, en favorisant notamment la réexpression de la E-cadhérine (Castillo *et al.*, 2016).

L'extravasation et l'intravasation des cellules métastatiques dépendent largement de l'interaction des cellules cancéreuses avec les sélectines présentes à la surface des cellules endothéliales. Il a été montré que les HS pouvaient servir de ligands aux sélectines et donc participer à ces processus (Martinez *et al.*, 2013). La migration des cellules métastatiques vers la circulation ainsi que leur sortie impliquent également la dégradation des constituants des matrices extracellulaires et notamment des HS qui y sont présents. Pour ce faire, les cellules cancéreuses produisent de l'héparanase (Tang *et al.*, 2002). D'ailleurs, des niveaux élevés d'héparanase ont été retrouvés dans le sérum et l'urine de patients atteints de cancers très agressifs et présentant des métastases (Nakajima *et al.*, 1988 ; Vlodaysky & Friedman, 2001). C'est en 1999 que Vlodaysky *et al.* ont observé pour la première fois le rôle direct de l'héparanase dans la formation des métastases. Ils ont noté que des cellules de lymphomes ou de mélanomes surexprimant cette enzyme adoptaient un comportement hautement métastatique. En effet, l'inoculation de ces cellules chez des souris entraînait l'apparition de métastases au niveau du foie ou des poumons et diminuait la survie. Par la suite, il a été montré que l'activité de l'héparanase dépendait de la voie NF- κ B. En effet, l'inhibition de cette voie conduit à diminution de son expression. Les capacités d'intravasation des cellules s'en trouvent alors diminuées, ce qui est à l'origine d'une diminution de la formation des métastases (Andela *et al.*, 2000).

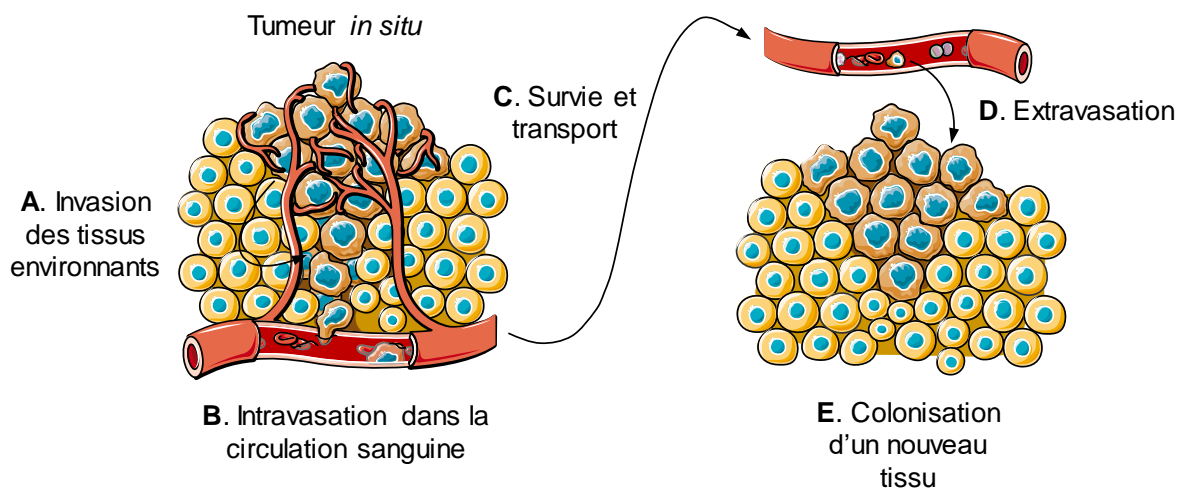


Figure 27 : Processus de formation des métastases. (A) La première étape du processus de formation des métastases correspond à l’envahissement des tissus environnants et donc à la rupture de la lame basale. (B) Les cellules tumorales doivent ensuite rejoindre les endothélias afin de rentrer dans les circulations, ici la circulation sanguine. Ce phénomène est appelé intravasation. (C) Les cellules cancéreuses sont alors transportées grâce au flux sanguin et doivent survivre. Les cellules tumorales qui sont entrées dans la circulation lymphatique seront piégées dans les ganglions pour donner naissance à des métastases ganglionnaires. (D) Les cellules cancéreuses circulantes doivent alors freiner leur transport pour sortir de la circulation sanguine au cours d’un phénomène appelé extravasation. (E) La cellule échappée de la circulation sanguine doit alors survivre dans un environnement qui lui est étranger, ce qui déterminera sa capacité à proliférer et donc à coloniser de nouveaux tissus. Le processus métastatique est un processus relativement lent et inefficace en raison des nombreuses contraintes auxquelles les cellules sont confrontées. En moyenne, moins de 1 cellule sur 10000 sera capable de coloniser de nouveaux tissus.

II. Thérapies anticancéreuses basées sur les HS

Bien que les HS soient impliqués dans divers processus associés au cancer, peu de médicaments basés sur leurs propriétés ont été développés. Les thérapies anticancéreuses basées sur les HS reposent essentiellement sur la création d’interférences dans les interactions avec leurs ligands. L’objectif est de perturber voire d’empêcher l’établissement de ces interactions par l’utilisation de compétiteurs solubles qui peuvent être des dérivés ou des mimétiques d’héparine ou de HS, ainsi que des analogues de leurs ligands. Ces compétiteurs interagissent donc soit avec les ligands des HS, soit avec les HS présents à la surface des cellules, respectivement (Knelson *et al.*, 2014 ; van Wijk & van Kuppevelt, 2014 ; Weiss & Esko, 2018).

A. L’héparine, un HS aux propriétés anticancéreuses

L’héparine est utilisée depuis plus de 70 ans à des fins thérapeutiques pour soigner notamment des maladies thrombo-emboliques grâce à son activité anticoagulante. Il a d’ailleurs longtemps été suggéré que ses effets antitumoraux n’étaient dus qu’à son activité anticoagulante. Les résultats de 11 essais cliniques ont toutefois montré que l’héparine était la molécule anticoagulante dont l’action antitumorale était la plus importante, suggérant donc

que ses effets n'étaient pas seulement dus à son activité anticoagulante et qu'il existait d'autres mécanismes sous-jacents (Sasisekharan *et al.*, 2002 ; Kuderer *et al.*, 2007). En effet, des travaux utilisant des héparines modifiées chimiquement pour limiter ou éliminer leur activité anticoagulante montrent que ces héparines conservent tout de même des effets antitumoraux (Niers *et al.*, 2007).

En thérapie, on distingue l'héparine non fractionnée UFH (*Unfractionated Heparin*) et les HBPMs (Héparines de Bas Poids Moléculaire). L'utilisation des HBPMs est préférée de nos jours puisque ces héparines sont plus faciles à administrer, présentent une demi-vie plus longue, ne nécessitent pas de suivi permanent, et permettent de diminuer les effets secondaires tout en restant biologiquement actives (Knelson *et al.*, 2014 ; Javadinia *et al.*, 2018). L'analyse de cinq essais cliniques réalisés avec de l'UFH ou des HBPMs entre 1994 et 2006 a montré que de tels traitements anticancéreux augmentaient globalement le taux de survie des patients. Toutefois, le traitement augmente aussi les risques d'hémorragie et semble moins efficace lorsque la maladie est à un stade avancé (Akl *et al.*, 2007). Dans chaque cas, les taux de survie ont été comparés entre un groupe de patients qui a reçu le traitement et un autre qui a reçu un placebo pendant des durées variables. Dans tous les cas, les effets bénéfiques sur la survie des patients ont été obtenus après l'arrêt du traitement. Ces résultats montrent donc que l'augmentation de la survie n'est pas due à une diminution du risque de thrombose veineuse et d'embolie pulmonaire : les héparines utilisées agissent en profondeur sur les cellules cancéreuses (Javadinia *et al.*, 2018). En effet, c'est en interférant dans différents processus importants pour le développement des cellules cancéreuses que l'héparine exerce son action antitumorale (Figure 28) (Falanga *et al.*, 2007). Cela étant, une des limites de ces études est la grande diversité des groupes de patients, qui sont atteints de différents types de cancer à différents stades. Ainsi, il semble que les effets des HBPMs soient très différents selon les sous-groupes de patients. En ce sens, il a déjà été observé lors d'essais cliniques que l'utilisation de HBPMs pour traiter des patients atteints de cancer, même si elle limite les risques de thromboembolie veineuse, n'avait pas d'effet sur la progression du cancer (Agnelli *et al.*, 2009 ; Agnelli *et al.*, 2012). Malgré cela, en raison des faibles risques encourus par son utilisation, de sa faible toxicité et des résultats positifs précédemment obtenus, d'autres essais cliniques sont envisageables et nécessaires pour préciser l'efficacité d'action des HBPMs contre divers types de cancer.

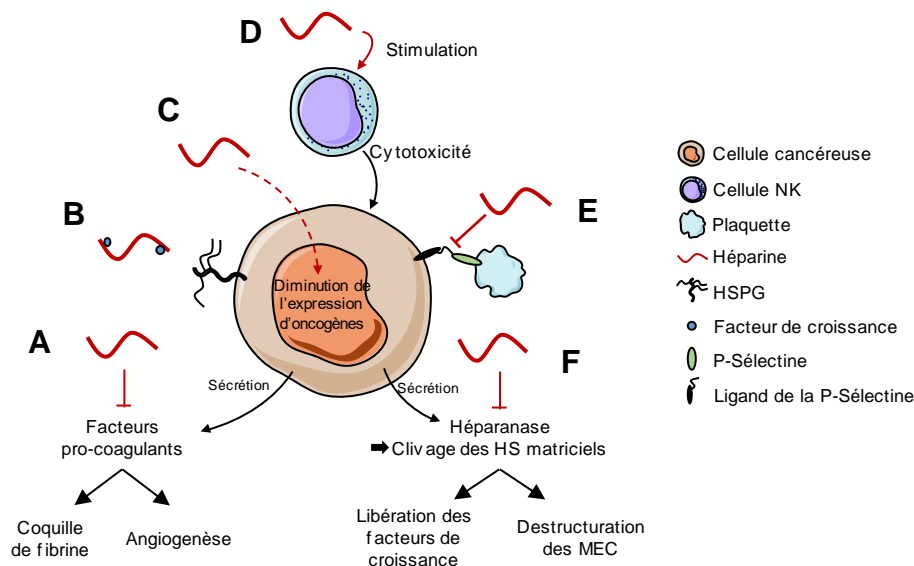


Figure 28 : Les différentes actions anticancéreuses de l'héparine. (A) Inhibition de la coagulation. (B) Séquestration des facteurs de croissance. (C) Modifications de l'expression d'oncogènes. (D) Stimulation des cellules du système immunitaire. (E) Inhibition de l'interaction avec les plaquettes pour diminuer la formation de métastases. (F) Inhibition de l'héparanase.

1. Bénéfices multiples de la fonction d'anticoagulant : effets anti-angiogéniques et fragilisation des tumeurs

Les patients atteints de cancer souffrent souvent, en parallèle, de plusieurs dysfonctionnements qui ne permettent pas de maintenir une hémostasie normale. Ils présentent en effet des niveaux élevés de fibrinogène et une augmentation du nombre de plaquettes dans le sang. En fait, les cellules cancéreuses peuvent déclencher la coagulation en sécrétant des facteurs pro-coagulants mais aussi en interagissant avec les cellules sanguines, ce qui mène à une activation chronique pathologique du système de coagulation appelé « coagulation intravasculaire disséminée ». Cette activation est d'ailleurs favorisée par les traitements actuels tels que la chirurgie, le placement de cathéters ou la chimiothérapie (Falanga *et al.*, 2003).

L'activation de ce système a plusieurs conséquences. D'une part, elle conduit à la formation de petits caillots qui perturbent le flux sanguin et le bon fonctionnement des organes (Khorana *et al.*, 2012). D'autre part, elle favorise la progression tumorale (Falanga *et al.*, 2003 ; Palumbo *et al.*, 2005). Des facteurs pro-coagulants sont présents en grandes quantités dans l'environnement tumoral. Ils entraînent l'activation de la thrombine, qui aboutit à la formation d'une « coquille » de fibrine. Cette coquille protège les tumeurs du système immunitaire et leur confère une résistance à la chimiothérapie. De plus, la fibrine interagit avec des molécules de la MEC, des molécules d'adhérence et les cellules endothéliales. Elle favorise donc de manière indirecte la prolifération des cellules tumorales, leur invasion et la formation de métastases (Falanga *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été montré que les niveaux d'expression du facteur tissulaire, un facteur pro-coagulant qui est un activateur majeur du cycle de

coagulation, sont anormalement élevés dans les cellules cancéreuses et leur environnement (Han *et al.*, 2014). Le facteur tissulaire, en activant les facteurs de coagulation X et IX, peut être un inducteur de l'angiogenèse (Falanga *et al.*, 2007 ; Han *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces processus étant déclenché par des facteurs pro-coagulants, l'inhibition de la coagulation pourrait permettre de les limiter (Figure 28A). Des thérapies anticancéreuses basées sur les fonctions anti-coagulantes de l'héparine ont donc été développées pour bloquer la formation de la coquille de fibrine mais aussi l'angiogenèse induite par la coagulation. En effet, l'héparine est connue depuis plus de 40 ans pour sa capacité à inhiber le bourgeonnement de vaisseaux sanguins dans le cadre de cancers (Folkman *et al.*, 1983). Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'héparine inhibait la voie activée par le facteur tissulaire, en l'inhibant directement ou en entraînant la synthèse de son inhibiteur, le TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*) (Lawson *et al.*, 1993 ; Rao *et al.*, 1995). Ces mêmes effets ont été retrouvés suite à l'utilisation de HBPMs (Mousa *et al.*, 2004).

2. Effets sur la prolifération et le système immunitaire

La prolifération cellulaire anarchique est une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses. Il a été suggéré que l'héparine pouvait inhiber ce processus même si cette hypothèse reste controversée (Smorenburg & Van Noorden, 2001). Les HBPMs peuvent moduler les interactions entre les cellules tumorales et les facteurs de croissance environnants, et donc inhiber la prolifération cellulaire, en agissant comme un mimétique des HS et en séquestrant les facteurs solubles (Figure 28B) (Javadinia *et al.*, 2018). De plus, les HBPMs sont capables d'inhiber l'expression et les fonctions de protéines oncogéniques, comme c'est le cas pour la protéine c-Myc (Figure 28C). La protéine c-Myc est un oncogène dont l'expression est fréquemment augmentée durant l'oncogenèse de nombreux types de cancers et qui régule la prolifération et la différenciation cellulaires (Wahlström & Henriksson, 2015). Il a été montré qu'un traitement de cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 avec de l'énoxaparine, qui est une HBPM, inhibe l'expression de c-Myc chez ces cellules, ayant pour effet non seulement une diminution de la prolifération mais aussi une induction de l'apoptose (Abu Arab *et al.*, 2011). Au niveau moléculaire, l'héparine empêche la transduction du signal *via* la protéine kinase C en inhibant la phosphorylation des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Ottlinger *et al.*, 1993 ; Mishra-Gorur & Castello, 1999). Toutefois, l'analyse de plusieurs essais pré-cliniques suggère qu'une concentration importante d'héparine est requise sur le lieu de la tumeur pour inhiber la croissance tumorale. Ainsi, seules des hautes doses d'héparine pourraient être utilisées à cette fin (Niers *et al.*, 2007).

Une des autres actions antitumorales de l'héparine est liée à sa capacité à directement moduler l'activité des cellules immunitaires. La L-sélectine se trouve à la surface des leucocytes et est nécessaire à leur migration vers les lieux de l'inflammation mais également à leur sortie

des tissus lymphoïdes (Ivetic, 2018). L'héparine est capable d'empêcher la liaison de la L-sélectine à ses ligands, ce qui inhibe l'extravasation des leucocytes et donc favorise leur action antitumorale (Norgard-Sumnicht *et al.*, 1993 ; Smorenburg & Van Noorden, 2001). De plus, l'héparine peut moduler l'activité des leucocytes en augmentant leur production de radicaux superoxydes (Leculier *et al.*, 1993 ; Itoh *et al.*, 1995). Plus particulièrement, l'héparine stimule l'activité antitumorale des cellules NK (Figure 28D). En effet, des expériences *in vitro*, *in vivo* chez des souris et *ex vivo* utilisant des échantillons prélevés chez des patients atteints de carcinomes pulmonaires ont montré qu'un traitement avec des HBPMs conduisait à une augmentation de la lyse induite par les cellules NK (Bobek *et al.*, 2005).

3. Effets anti-métastatiques

L'effet anticancéreux majoritaire de l'héparine provient de sa capacité à empêcher la formation de métastases. En effet, l'analyse de 70 études portant sur les effets de l'héparine sur la formation de métastases primaires, qui sont des métastases viscérales observées après administration de cellules cancéreuses en intraveineuse, ou secondaires, qui sont observées après injection de cellules cancéreuses en sous-cutané, montre que dans une grande partie des cas, un traitement à l'héparine conduit à une diminution significative du nombre de métastases (Niers *et al.*, 2007).

L'effet anti-métastatique de l'héparine repose essentiellement sur le fait qu'elle inhibe de manière spécifique les interactions entre la P-sélectine présente sur les plaquettes et ses ligands présents sur les cellules cancéreuses (Figure 28E) (Norgard-Sumnicht *et al.*, 1993 ; Koenig *et al.*, 1998). En effet, les cellules cancéreuses interagissent avec les plaquettes dans la circulation sanguine grâce notamment à la P-sélectine. La mise en place de ces interactions conduit à la formation d'un « bouclier » de plaquettes autour des cellules cancéreuses, ce qui favorise l'adhérence, le ralentissement et l'arrêt des cellules cancéreuses sur l'endothélium vasculaire (Menter *et al.*, 2014). Il a été observé, *in vitro* et *in vivo*, que l'héparine empêchait la formation des interactions entre les plaquettes et les cellules cancéreuses, ce qui défavorise l'adhérence de ces cellules sur les endothéliums vasculaires et donc diminue les chances d'extravasation. De plus, la diminution du nombre de plaquettes autour des cellules circulantes pourrait aussi entraîner l'augmentation des interactions avec des macrophages éliminant les cellules cancéreuses (Borsig *et al.*, 2001). Il a aussi été suggéré que l'inhibition par l'héparine de l'établissement des interactions entre la L-sélectine présente à la surface des leucocytes et ses ligands conduisait à une inhibition de la formation des métastases (Stevenson *et al.*, 2007).

Un autre mécanisme est également à l'origine des propriétés anti-métastatiques de l'héparine. Une des conditions nécessaires à l'invasion des cellules cancéreuses est la dégradation des molécules formant la MEC. En sécrétant des enzymes dont la fonction est de dégrader les matrices, les cellules cancéreuses favorisent leur propre invasion (Bonnans *et al.*,

2014). Elles produisent notamment de l'héparanase qui est essentielle au clivage des HS matriciels (Gross-Cohen *et al.*, 2016). L'étude de biopsies a d'ailleurs montré que l'expression de cette enzyme était augmentée dans différents types de cancers (Ginath *et al.*, 2001 ; Koliopoulos *et al.*, 2001 ; Maxhimer *et al.*, 2002). De plus, des taux importants d'héparanase ont été associés à une diminution de la survie des patients, soulignant l'importance de l'enzyme dans la progression tumorale (Koliopoulos *et al.*, 2001). Au niveau moléculaire, l'action de l'héparanase est double. D'une part, elle participe à la dégradation de la MEC pour faciliter l'invasion des cellules cancéreuses. D'autre part, les HS des matrices servant de réservoir de facteurs de croissance, son action libère des fragments de HS bioactifs, liés à des facteurs de croissance qui peuvent alors être présentés à leurs récepteurs à la surface des cellules cancéreuses (Vlodavsky *et al.*, 2001). Il a ainsi été montré que l'héparine était capable d'inhiber ces activités de l'héparanase, ce qui a été relié à une diminution de la formation de métastases (Figure 28F) (Niers *et al.*, 2007).

B. Utilisation de mimétiques des HS

1. Dérivés d'héparine

L'utilisation d'analogues solubles des HS conduit à la séquestration des ligands pour les rendre inactifs. Une des possibilités d'obtention de ces analogues est de modifier chimiquement l'héparine (Figure 29A) pour obtenir des dérivés moins sulfatés. Ils peuvent être obtenus après une désulfatation contrôlée qui se déroule en deux étapes au cours desquelles différentes formes sont obtenues (Figure 29B et C) : l'héparine subit d'abord une oxydation totale au periodate de sodium, puis elle est soumise à une réduction au borohydrure. Il en résulte des molécules qui contiennent des séquences de trisaccharides pentasulfatés composées d'acides uroniques 2-*O*-désulfatés et de GlcN *N*- et 6-*O*-sulfatés qui sont séparées par des acides uroniques réduits et dont le cycle a été rompu (Figure 29D) (Casu *et al.*, 2002). Cependant, à la différence de l'héparine, ces molécules n'interagissent pas avec l'antithrombine et ne présentent donc pas d'activité anti-coagulante (Casu *et al.*, 2002 ; Casu *et al.*, 2010 ; Zhou *et al.*, 2011).

Ces dérivés d'héparine peuvent toujours agir sur plusieurs molécules qui interagissent avec les HS. Ainsi, en plus de défavoriser la dimérisation du FGF-2 et l'interaction avec son récepteur, ils empêchent la présentation du VEGF à son récepteur et inhibent l'héparanase. Ils sont donc plus efficaces pour inhiber la prolifération et l'angiogenèse (Casu *et al.*, 2004 ; Naggi *et al.*, 2005 ; Pisano *et al.*, 2005). Des études précliniques montrent que le traitement de souris atteintes de myélomes ou de sarcomes par de telles molécules conduit globalement à une diminution de l'activation de différents récepteurs tyrosine kinase. En outre, il a été observé une diminution de l'expression du HGF et du VEGF et une diminution du *shedding* du syndécan-

1 induit par l'héparanase. *In fine*, ces molécules entraînent une diminution de la prolifération cellulaire et de la vascularisation des tumeurs. Leurs effets peuvent ainsi compléter l'action de molécules anticancéreuses, telle que la combinaison avec l'irinotecan, qui est une thérapie déjà existante (Ritchie *et al.*, 2011 ; Cassinelli *et al.*, 2016).

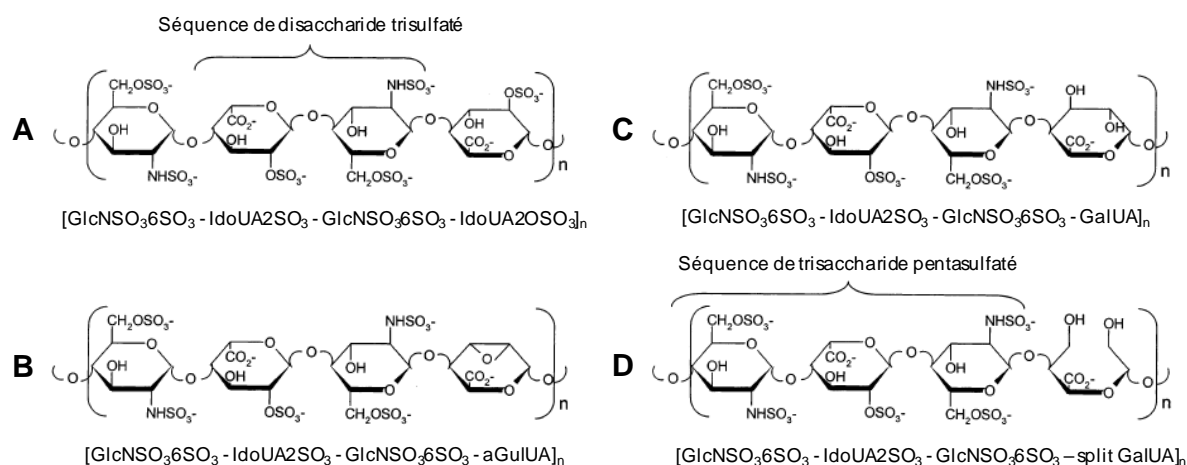


Figure 29 : L'héparine et ses dérivés obtenus par modifications chimiques. (A) Héparine. (B) Héparine partiellement époxydée. (C) Héparine présentant 50% de 2-OH non sulfatés. (D) Héparine présentant 50% de 2-OH non sulfatés et dont le cycle de l'acide uronique qui sépare les séquences de trisaccharides pentasulfatés a été réduit. D'après Casu *et al.*, 2002.

2. Autres types de mimétiques de HS

La modification chimique de l'héparine n'est pas le seul moyen pour obtenir des analogues des HS. Il est également possible d'extraire des mimétiques depuis des micro-organismes, comme dans le cas du PI-88, une molécule dont les effets anticancéreux sont actuellement à l'étude. Le PI-88 a été identifié comme étant prometteur pour la mise en place de thérapies contre le cancer pour la première fois par Parrish *et al.* en 1999. Il a d'ailleurs atteint la phase de développement clinique pour le traitement de tumeurs solides (Dredge *et al.*, 2018 ; Hammond *et al.*, 2018). Le PI-88 est un mélange d'oligosaccharides de tailles pouvant aller du disaccharide à l'hexasaccharide, les composants majeurs étant les tétrasaccharides et les pentasaccharides. Ces derniers représentent 30% et 60% du mélange respectivement, et sont responsables des effets anticancéreux du PI-88. Ils sont hautement sulfatés, composés de mannoses monophosphorylés, et présentent une très faible activité anticoagulante. Le PI-88 est actuellement préparé par sulfatation totale d'un phosphomannane produit par *Pichia holstii* (Cochran *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 2002 ; Ferro *et al.*, 2001).

L'utilisation du PI-88 conduit à l'inhibition de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. En plus d'entraîner une diminution de 30% de la vascularisation des tumeurs chez des rats atteints d'adénocarcinomes très invasifs, le traitement induit des diminutions d'environ 50% de la croissance des tumeurs primaires et d'environ 40% du taux de métastases (Parrish *et al.*, 1999). D'autres tests ont par la suite confirmé l'effet anti-angiogénique du PI-88 (Hazel, 2003). Au niveau moléculaire, le PI-88 se lie au FGF2 et au VEGF avec une plus grande affinité que

les HS. Il empêche donc la formation des complexes ternaires HS/ligand/récepteur. Le PI-88 est également capable d'inhiber l'héparanase, ce qui est à l'origine de ses propriétés anti-métastatiques (Cochran *et al.*, 2003 ; Francis *et al.*, 2003 ; Joyce *et al.*, 2005).

Grâce à la chimie, de nouveaux composés basés sur la structure du PI-88 ont été synthétisés et leurs activités anti-angiogéniques et anti-métastatiques testées *in vitro* et *in vivo*, notamment chez des souris souffrant de mélanomes. Ces composés se sont avérés plus efficaces que le PI-88, avec une activité anti-coagulante encore plus faible. Ils forment la série de molécules nommée PG500, optimisée pour le développement de médicaments. En effet, ces substances ne sont plus des oligosaccharides en mélange mais des oligosaccharides purifiés, hautement sulfatés et d'anométrie pure. De plus, une partie aglycone lipophile a été ajoutée au niveau de l'extrémité réductrice pour augmenter l'activité biologique en conférant de meilleures propriétés pharmacocinétiques (Dredge *et al.*, 2010 ; Johnstone *et al.*, 2010).

Parmi ces molécules, le PG545 a été sélectionné pour des essais pré-cliniques (Figure 30). Plusieurs études ont confirmé son potentiel anticancéreux *in vitro* chez des cellules de cancer du pancréas ou des ovaires, et *in vivo* en utilisant différentes méthodes d'induction de cancer chez des souris (Ostapoff *et al.*, 2013 ; Jung *et al.*, 2014 ; Winterhoff *et al.*, 2015 ; Singh *et al.*, 2017). De manière intéressante, il a été montré que le traitement avec le PG545 d'animaux présentant des tumeurs empêchait l'induction de la TEM en renforçant les jonctions cellule-cellule et l'adhérence cellulaire qui sont des caractéristiques des cellules épithéliales (Ostapoff *et al.*, 2013). Il a également été observé qu'un tel traitement conduisait à une modulation de la réponse immunitaire. En effet, le PG545 entraîne une diminution de l'infiltration de cellules immunitaires tolérantes au sein des tumeurs et une inhibition des TAM (*Tumor Associated Macrophage*). A l'opposé, il entraîne une activation des cellules dendritiques et des cellules NK, deux types cellulaires dont l'activité anticancéreuse dépend du TLR9 (*Toll Like Receptor*), ce qui conduit à la sécrétion d'IL-12 (Ostapoff *et al.*, 2013 ; Brennan *et al.*, 2016). De plus, l'action du PG545 est potentialisée lorsqu'il est utilisé en combinaison avec des thérapies existantes comme le gemcitabine (Jung *et al.*, 2014) ou le paclitaxel (Winterhoff *et al.*, 2015).

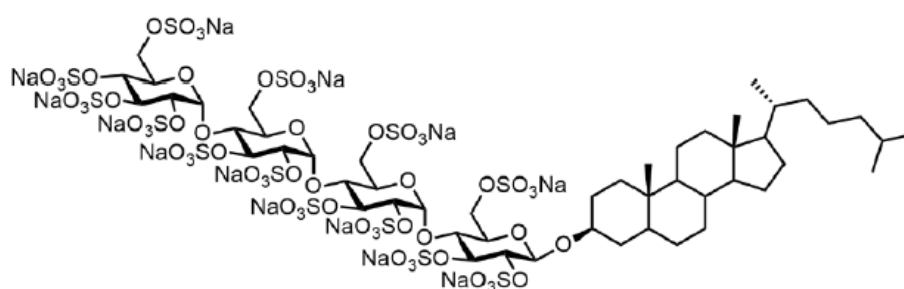


Figure 30 : Structure du PG545. D'après Hammond *et al.*, 2018.

L'ensemble de ces données a donc permis d'appréhender de nouvelles possibilités de thérapies chez l'homme et des résultats d'essais cliniques ont été publiés récemment. Ces premiers essais ont montré que le traitement de patients atteints de tumeurs solides au niveau du côlon, du pancréas ou de la thyroïde entraînait une augmentation de la concentration sanguine de VEGF, qui peut être due à l'inhibition de l'interaction avec son récepteur. Les niveaux de VEGF plasmatiques pourraient alors servir de marqueur quant à l'efficacité du traitement (Winterhoff *et al.*, 2015). Des essais cliniques plus récents ont montré que l'administration du PG545, alors renommé pixatimode, chez des patients atteints de tumeurs solides à un stade avancé n'entraînait pas de toxicité particulière et stimulait les cellules immunitaires. Ces derniers résultats semblent prometteurs et confirment ceux obtenus grâce aux études précliniques. Ils permettent d'envisager l'utilisation du PG545 en combinaison avec des thérapies anticancéreuses actuelles (Dredge *et al.*, 2018 ; Hammond *et al.*, 2018). Cependant, même si l'utilisation du PG545 contre les cellules cancéreuses semble très efficace *in vitro*, des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer son potentiel en tant que molécule anticancéreuse.

C. Utilisation d'analogues des ligands

Pour empêcher la formation des interactions entre les HS et leur ligand, il est également possible de bloquer les HS présents à la surface des cellules. Même si cette stratégie fait l'objet de nombreuses recherches dans le cadre de pathologies vasculaires, inflammatoires ou infectieuses, peu d'études concernent l'utilisation d'antagonistes pour des thérapies anticancéreuses (Weiss & Esko, 2018). Les antagonistes des HS peuvent être de natures très diverses, allant de molécules synthétiques de faibles poids moléculaires à des peptides cationiques. Les interactions qu'ils établissent avec les HS dépendent essentiellement de forces électrostatiques (van Wijk & van Kuppevelt, 2014).

1. Molécules de bas poids moléculaire

Un criblage d'une banque de données de l'Institut National du Cancer américain pour rechercher des molécules antagonistes des HS a permis d'identifier le bis-2-méthyl-4-aminoquinolyl-6-carbamide, une aminoquinoline symétrique dimérique aussi appelée surfen, comme un candidat potentiel ayant une forte action anti-angiogénique (Figure 31A) (Schuksz *et al.*, 2008). Cette petite molécule de 372 Da se lie à tous les types de GAGs, mais a plus d'affinité pour l'héparine et les HS. Les caractéristiques de l'interaction ne sont pas clairement établies mais ils semblent que les groupements chargés tels que les groupements carboxyliques et les sulfates soient nécessaires, suggérant la mise en place d'interactions électrostatiques. *In vitro*, il a été observé que la liaison du surfen aux HS diminuait la présentation du FGF-2 à ses récepteurs, ce qui conduisait à une inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins

(Schuksz *et al.*, 2008). De plus, l'utilisation du surfen conduit à une inhibition du VEGF-R2 de manière dose-dépendante (Xu *et al.*, 2011). Même si ces données illustrent le potentiel thérapeutique du surfen, ce composé s'est avéré être relativement peu efficace lors d'essais pré-cliniques. Dans le but d'obtenir des effets plus marqués, des analogues du surfen ont été synthétisés (Figure 31B). Ces derniers présentent une activité inhibitrice plus importante vis-à-vis du FGF-R (Weiss *et al.*, 2015). Cependant, des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer le potentiel anticancéreux de la molécule.

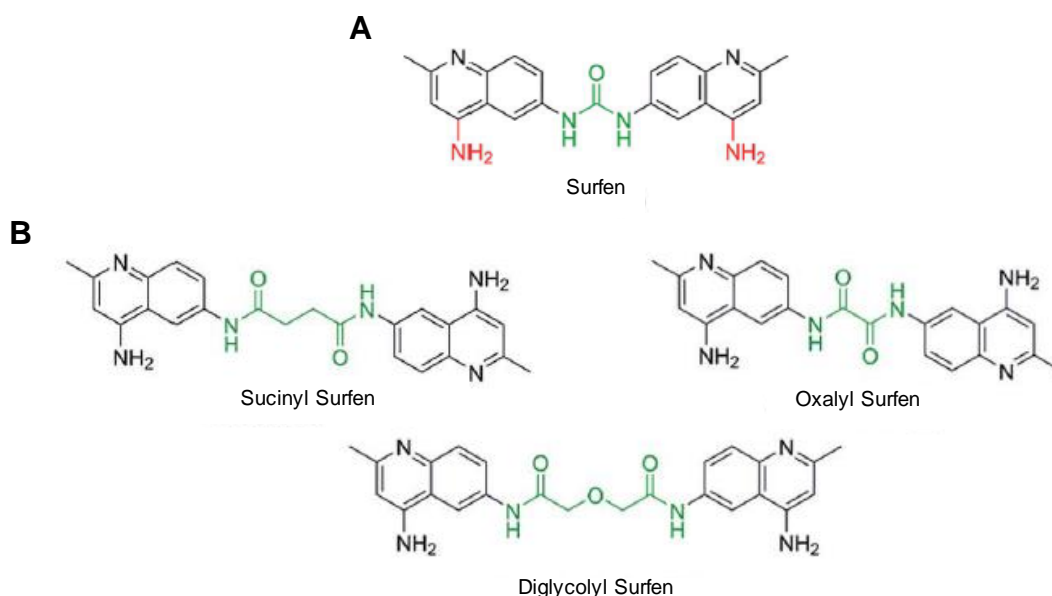


Figure 31 : Structures du surfen (A) et de ses dérivés (B). Les parties du surfen qui ont été modifiées lors de la synthèse de ses dérivés sont indiquées en rouge et en vert. D'après Weiss *et al.*, 2015.

2. Peptides anticancéreux

La grande diversité structurale des HS combinée au fait que leur structure est très variable chez les cellules cancéreuses rend le développement d'analogues de ligands des HS particulièrement complexe. En effet, selon les contextes, un même antagoniste pourrait présenter plus ou moins d'affinité pour les HS (Sasisekharan *et al.*, 2002). Un enjeu majeur du design de telles molécules est donc la spécificité de reconnaissance entre les HS et les antagonistes, ce qui nécessite la mise au point de stratégies particulières. Une des stratégies développées consiste à produire des peptides synthétiques dont les séquences en acides aminés sont basées sur celles trouvées dans les domaines de liaisons à l'héparine des HSBPs. Le peptide agit alors comme un compétiteur vis-à-vis de la protéine à partir de laquelle sa séquence a été inspirée. Par exemple, Lee *et al.* (2010) ont synthétisé un peptide de 20 acides aminés correspondant au domaine de liaison du VEGF à l'héparine. Leurs travaux *in vitro* ont montré que ce peptide empêchait la formation de complexes VEGF/VEGFR chez différentes lignées cellulaires et inhibait la migration des cellules endothéliales. De plus, le traitement de

souris atteintes de carcinomes et de liposarcomes par ce peptide entraîne une inhibition de l'angiogenèse et de la croissance des tumeurs.

D'autres travaux utilisent une stratégie légèrement différente pour bloquer les effets dus au HGF et au VEGF (Cecchi *et al.*, 2012). Les sites de liaison aux HS de l'isoforme NK1 du HGF et du VEGF-165, bien qu'ils diffèrent en termes de séquences primaires et de repliement, présentent trois acides aminés basiques agencés dans l'espace de manière comparable. Il en résulte une répartition de charges positives très similaire à la surface de ces deux facteurs. Les auteurs ont donc pris le parti de construire des plasmides d'expression particuliers pour aboutir, après transfection, à la synthèse de mutants des HGF et VEGF chez lesquels ces trois acides aminés basiques ont été remplacés par trois acides aminés acides pour perturber la distribution des charges. De manière intéressante, ces facteurs mutés se sont avérés être des antagonistes puissants et sélectifs de leur forme sauvage. En effet, des travaux *in vivo* au cours desquels des cellules cancéreuses surexprimant ou non ces formes chimères ont été inoculées chez des souris ont montré que la présence des facteurs modifiés conduisait à une inhibition des effets dus aux formes normales des HGF et VEGF, diminuant notamment la croissance des tumeurs, la formation de métastases et l'angiogenèse.

3. Cas de l'endostatine

Il est également envisageable de détourner des processus physiologiques à des fins thérapeutiques comme dans le cas de l'utilisation de l'endostatine. L'endostatine correspond au fragment C-terminal du collagène XVIII et a une masse moléculaire d'environ 20 kDa (Seppinen & Pihlajaniemi, 2010). Bien que le collagène XVIII n'ait pas été décrit comme jouant un rôle dans l'angiogenèse dans un contexte tumoral, son fragment C-terminal peut se lier aux HS et limiter leur interaction avec les FGFs. Le potentiel anticancéreux de l'endostatine a été décrit pour la première fois en 1997 par O'Reilly *et al.* Il a alors été observé que lorsqu'une forme d'endostatine recombinante produite chez *Escherichia coli* était administrée chez des souris souffrant de carcinomes, les cellules formant les tumeurs primaires ne proliféraient plus et l'angiogenèse était bloquée, inhibant ainsi la formation et le développement des métastases. Le potentiel thérapeutique de l'endostatine était tellement prometteur qu'elle a rapidement été testée dans une phase I d'essai clinique, mais sans succès (Mundhenke *et al.*, 2001).

Cependant, ces résultats décevants ont probablement été dus, au moins en partie, à la forte instabilité de la molécule. Un dérivé de l'endostatine, appelé rh-endostatine ou endostar, a donc été synthétisé. Par rapport à l'endostatine, l'endostar présente une séquence de 9 acides aminés supplémentaires à son extrémité N-terminale. Elle comporte notamment 5 histidines qui forment une séquence histidine tag. Cette nouvelle protéine présente donc la capacité de chélater des ions divalents, ce qui la rend plus facile à purifier et aussi plus stable (Song *et al.*, 2005). Par la suite, il a été montré que les effets anti-angiogéniques de l'endostar

étaient plus puissants que ceux de l'endostatine (Ling *et al.*, 2007). L'endostar présentant à son tour un fort potentiel anticancéreux, son utilisation a été acceptée par la CFDA (*China Food and Drug Administration*) en 2005 après plusieurs essais pré-cliniques pour le traitement de cancer du poumon non à petites cellules (Li *et al.*, 2018). Une quinzaine d'essais cliniques, réalisés entre 2005 et 2012 et rassemblant au total près de 2000 patients, ont montré que l'utilisation de l'endostar combinée à des chimiothérapies existantes avait des effets bénéfiques certains. En effet, elle permet de mieux contrôler la maladie en augmentant le taux de survie sur un an, de diminuer les effets secondaires, et d'augmenter la qualité de vie des patients (Rong *et al.*, 2012). De nombreuses autres études plus récentes, dont des essais pré-cliniques et cliniques, ont confirmé ces résultats (An & Lv, 2018 ; Yu *et al.*, 2018 ; Yin *et al.*, 2018).

En parallèle de la méthode d'administration intraveineuse classique, une approche par thérapie génique pour distribuer la séquence codante d'intérêt aux cellules cancéreuses est en développement. Les premiers essais de surexpression d'endostatine réalisées par cette approche ont été réalisés lors d'essais pré-cliniques grâce à l'utilisation d'adénovirus pouvant cibler de manière spécifique les cellules cancéreuses (Li *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2013). Il est également possible d'administrer l'endostatine grâce à une souche atténuée de *Salmonella typhimurium*, comme cela a été effectué avec succès dans un modèle murin (Liang *et al.*, 2018). Plusieurs travaux ont démontré l'efficacité de cette technique. Par exemple, la combinaison de la radiothérapie à l'utilisation d'endostatine administrée par thérapie génique montre des effets supérieurs par rapport ceux obtenus avec chaque traitement utilisé individuellement (Huiqi *et al.*, 2015). De la même manière, l'utilisation de plusieurs inhibiteurs de l'angiogenèse que sont l'endostatine et l'angiostatine délivrées par thérapie génique ou la combinaison avec un traitement au TNF- α augmentent les effets anticancéreux (Yan *et al.*, 2012 ; Kubo *et al.*, 2015). En plus d'inhiber la croissance tumorale et l'angiogenèse, l'endostatine délivrée par thérapie génique empêche aussi la polarisation M2 des macrophages en TAM tolérants chez des souris, ce qui favorise l'élimination des tumeurs (Foguer *et al.*, 2016).

PARTIE 5 : LA 3-O-SULFATATION DES HEPARANES SULFATES, UNE MODIFICATION ENCORE INCOMPRISE

La 3-*O*-sulfatation est la modification la plus rare des HS et ses fonctions sont encore largement incomprises. Si des centaines de HBPs ont été identifiées, peu d'entre elles nécessitent la présence d'un groupement 3-*O*-sulfate pour interagir avec l'héparine. En effet, la 3-*O*-sulfatation est une particularité structurale peu étudiée et moins d'une dizaine de protéines, intervenant dans des processus aussi bien physiologiques que pathologiques, ont été décrites pour se lier sélectivement aux HS 3-*O*-sulfatés : l'antithrombine, certains facteurs de croissance de la famille des FGFs, la cyclophiline B, les stabiline-1 et -2, la protéine HSV-1 gD et la neuropiline-1 (Nrp-1) (Lindahl *et al.*, 1980 ; McKeehan *et al.*, 1999 ; Shukla *et al.*, 1999 ; Ye *et al.*, 2001 ; Vanpouille *et al.*, 2007 ; Pempe *et al.*, 2012 ; Thacker *et al.*, 2016).

I. Fonctions physiologiques de la 3-O-sulfatation

A. Activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des HS vient de leur capacité d'interaction avec l'AT-III, une protéine de la famille des serpinines (*Serine Protease Inhibitor*). C'est le ligand dont l'interaction avec les HS 3-*O*-sulfatés a été la mieux caractérisée. La capacité des HS à interagir avec l'AT-III a été découverte en 1980 par Lindahl *et al.* Si la découverte de protéines dont la fixation est régulée par la présence de motifs 3-*O*-sulfatés est difficile, l'analyse des séquences reconnues par ces ligands l'est encore plus en raison de la difficulté à obtenir les quantités nécessaires de tels HS. Dans le cas de l'AT-III, ce procédé a été plus simple à mettre en œuvre grâce à la très forte affinité qui existe entre elle et certains motifs de l'héparine. Ces derniers ont ainsi pu être obtenus dans des quantités très importantes, ce qui a facilité les études structurales (Höök *et al.*, 1976 ; Hopwood *et al.*, 1976 ; Lindahl *et al.*, 1979, 1980, 1983 ; Riesenfeld *et al.*, 1981 ; Atha *et al.*, 1985). Des études génétiques ont montré que l'enzyme essentiellement responsable de la synthèse des motifs de fixation de l'AT-III est HS3ST1. Cependant, les souris HS3ST1^{-/-} ne montrent étonnamment pas d'anomalie de la coagulation. Ainsi, une quantité non négligeable de HS pouvant interagir avec l'AT-III est retrouvée lorsque HS3ST1 est déficiente. Ceci suggère donc que les HS peuvent être 3-*O*-sulfatés grâce à l'action d'une autre HS3ST (HajMohammadi *et al.*, 2003). En particulier, il a été montré que HS3ST5 était également capable de synthétiser le motif de fixation de l'AT-III (Zhang *et al.*, 2001b ; Esko & Selleck, 2002 ; Xia *et al.*, 2002). Les cellules surexprimant HS3ST2 ou 3A sont aussi capables de synthétiser des HS anticoagulants, même si ces derniers sont bien moins efficaces que ceux synthétisés par HS3ST1 (Liu *et al.*, 1999). De même, il a été observé que HS3ST6 pouvait être relativement efficace pour synthétiser des HS anticoagulants (HajMohammadi *et*

al., 2003). Finalement, la capacité de HS3ST3A à synthétiser des motifs interagissant avec l'AT-III a été vérifiée avec des oligosaccharides de synthèse (Wang *et al.*, 2017). Toutefois, les expériences de surexpression en cellules COS-7 montrent que même si HS3ST3A est capable de générer des HS anticoagulants, elle est bien moins efficace dans cette tâche que HS3ST1. De plus, la surexpression, dans ces mêmes cellules, de protéines chimères composées du domaine sulfotransférase d'une enzyme liée à la région N-terminale de l'autre a mis en évidence que les activités de HS3ST1 et de HS3ST3A n'étaient pas dictées par leur région N-terminale. Elles ne dépendent donc que de leur domaine sulfotransférase (Yabe *et al.*, 2001). L'ensemble de ces données pourrait être expliqué par le fait que les HS3STs de type gD possèdent des spécificités de substrat plus larges que HS3ST1 et seraient capables de sulfater des substrats qu'elles ne reconnaissent pourtant pas préférentiellement. Si ces dernières observations ne remettent pas en cause les distinctions entre HS3STs de type AT et gD, elles suggèrent néanmoins que les différences fonctionnelles entre ces deux sous-groupes pourraient être très fines.

L'activité anticoagulante de l'AT-III vient du fait qu'elle est un inhibiteur de la thrombine et du facteur Xa, qui sont des protéases jouant un rôle clé dans la mise en place de la cascade de coagulation. En absence de HS/héparine, l'AT-III ne peut pas interagir avec la thrombine ni avec le facteur Xa pour exercer son activité biologique. En effet, son interaction avec les motifs 3-*O*-sulfatés induit un changement de sa conformation, ce qui permet la mise en place du site d'interaction, l'AT-III pouvant alors former un complexe 1:1:1 avec le motif HS/héparine et la thrombine ou le facteur Xa (Figure 32A). Ce changement conformationnel augmente l'activité inhibitrice de l'AT-III pour la thrombine d'un facteur 9000, et pour le facteur Xa d'un facteur 17000 (Peterson *et al.*, 2009). Des études structurales ont suggéré que cette interaction était possible grâce à l'établissement de liaisons hydrogènes et électrostatiques impliquant plusieurs résidus d'acides aminés basiques et polaires de l'AT-III. La lysine 114, si elle n'est pas indispensable à l'interaction avec le groupement 3-*O*-sulfate, est nécessaire à l'activation de l'AT-III. Lorsque ce résidu est muté, l'interaction existe toujours mais l'inhibition de la thrombine est nettement moins importante. En effet, lors de l'interaction avec l'héparine, l'orientation de ce résidu est modifiée. Ceci entraîne une modification de la conformation de la protéine selon un arrangement tridimensionnel optimal à la formation des différentes liaisons hydrogènes, ce qui conduit au changement conformationnel de l'AT-III et donc permet son activité biologique (Richard *et al.*, 2009).

Le site minimum de fixation de l'AT-III a été identifié et correspond à un pentasaccharide de structure GlcNAc6S-GlcUA-GlcNS3S(±6S)-IdoUA2S-GlcNS6S (Figure 32B). Le fait que le motif de fixation de l'AT-III contienne un résidu de GlcUA en position -1 et un résidu de GlcNAc6S en position -2 suggère qu'il pourrait se situer au niveau des domaines de transition

NA/NS sur les chaînes HS (Thacker *et al.*, 2014). D'autre part, les groupements 6-*O*-sulfate et 3-*O*-sulfate sont impliqués dans l'établissement de plus de la moitié de l'énergie de liaison lors de l'interaction entre l'oligosaccharide et l'AT-III. En ce sens, il a été montré que l'affinité de l'AT-III pour ce pentasaccharide diminuait de manière très importante lorsque les groupements 3-*O*-sulfate du résidu de GlcNS(±6S) central ou 6-*O*-sulfate du résidu de GlcNAc en position -2 étaient absents, réduisant alors drastiquement l'induction du changement de conformation de la protéine (Atha *et al.*, 1985, 1987). Cela étant, le motif de liaison de l'AT-III n'est pas unique. Entre autres, il a été observé que la protéine pouvait se lier à un pentasaccharide similaire, à la différence près qu'il contient un autre groupement 3-*O*-sulfate sur le résidu de GlcNS6S en position +2. De plus, la présence du résidu IdoUA en position +1 ne semble pas obligatoire, de même que son groupement 2-*O*-sulfate (Zhang *et al.*, 2001b ; Chen *et al.*, 2008 ; Guerrini *et al.*, 2013). L'idée qu'il existe plusieurs motifs HS de liaison à l'AT-III est renforcée par le fait que les HS3ST3A et 6, qui présentent pourtant des spécificités de substrat distinctes de celles de HS3ST1, peuvent également générer des HS anticoagulants (Yabe *et al.*, 2001 ; HajMohammadi *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2017).

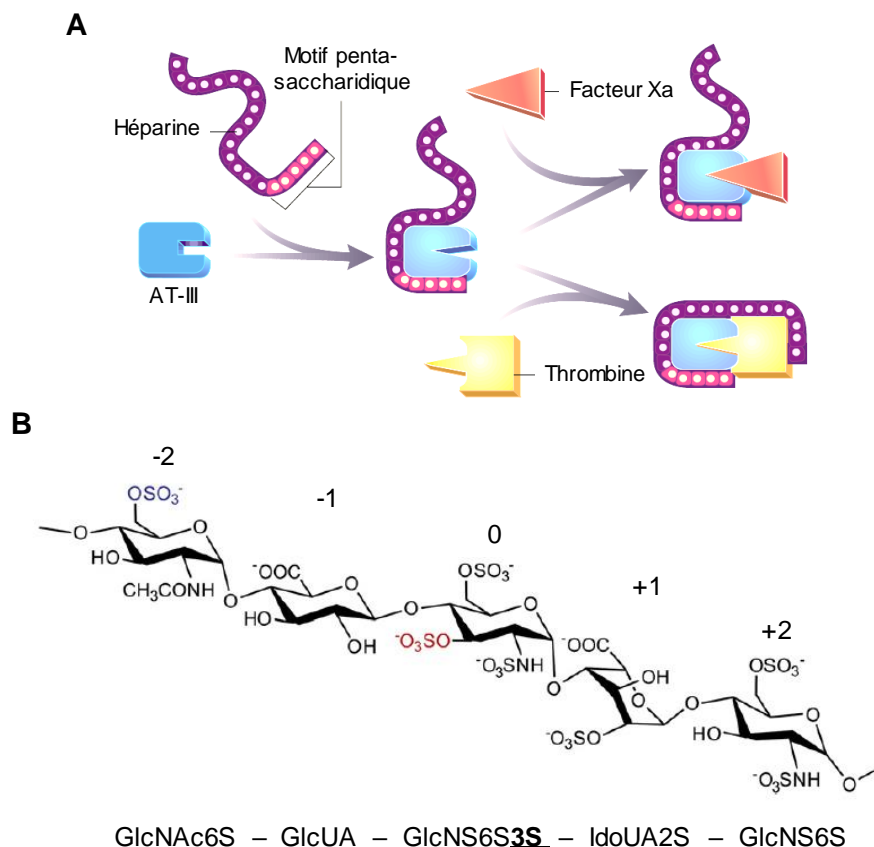


Figure 32 : Interaction de l'AT-III avec les HS. (A) Représentation schématique du mécanisme d'action de l'AT-III. D'après Weitz *et al.*, 1997. (B) Structure du motif pentasaccharidique de fixation de l'AT-III. Les résidus sont numérotés par rapport au résidu de GlcN 3-*O*-sulfaté central. Les groupements 6-*O*-sulfates et 3-*O*-sulfates, montrés en bleu et rouge respectivement, sont indispensables et sont impliqués dans la majorité de l'énergie de liaison. D'après Thacker *et al.*, 2014.

B. Fixation des facteurs de croissance

Même si l'interaction directe des FGFs avec des motifs 3-*O*-sulfatés n'a jamais été observée, plusieurs preuves indirectes suggèrent que certains de ces facteurs requièrent leur présence pour interagir avec les HS. Ainsi, des fragments d'héparine présentant une forte affinité pour l'antithrombine peuvent se lier aux FGF-R et favoriser la signalisation induite par le FGF-1, constituant ainsi la première preuve indirecte de la participation des groupements 3-*O*-sulfates dans l'interaction des HS avec les FGFs (McKeehan *et al.*, 1999). De manière cohérente, des études ultérieures ont démontré que des octasaccharides d'héparine, obtenus grâce à leur interaction avec du FGF-7 immobilisé, possédaient également une activité anticoagulante, et leur interaction avec le FGF-7 protège ce dernier de la protéolyse. De plus, la stimulation de kératinocytes de souris avec ces fractions d'héparine entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire induite par le FGF-7 (Ye *et al.*, 2001 ; Luo *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'interaction entre le FGF-8 et les HS 3-*O*-sulfatés a été suggérée lors du développement du poisson zèbre. Le fonctionnement des cils des vésicules de Kupffer, qui interviennent pendant la mise en place de l'axe gauche-droite chez le poisson zèbre, implique deux HS3STs. Il a été observé que l'inactivation de HS3ST5 entraînait une diminution de la longueur des cils en raison de la diminution de synthèse de facteurs de transcription nécessaires à leur synthèse. Étant donné que la synthèse et l'activation de ces facteurs de transcription dépendent de voies de signalisation activées par le FGF-8, les auteurs ont analysé l'implication de ce facteur de croissance. L'expression d'un faible taux de HS3ST5, lorsqu'elle est associée à une stimulation importante au FGF-8, n'a pas d'effet sur la longueur des cils. En revanche, un faible niveau d'expression de HS3ST5 combinée à une stimulation avec de faibles doses de FGF-8 conduit à la synthèse de cils plus courts, soulignant donc un mécanisme qui fait intervenir HS3ST5 et le FGF-8. Il est probable que la diminution de l'expression de HS3ST5 entraîne un défaut de fixation du FGF-8, mais cela n'a jamais été montré. Finalement, les motifs 3-*O*-sulfatés ne semblent pas indispensables à la fixation du FGF-8 mais pourraient augmenter son affinité vis-à-vis des HS (Neugebauer *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats constitue donc autant d'indices qui suggèrent que la présence de motifs 3-*O*-sulfatés favorise l'interaction avec les FGFs. Cependant, des travaux supplémentaires seront nécessaires pour apporter des preuves directes de l'interaction en analysant la structure des séquences de liaison aux FGFs.

C. 3-*O*-sulfatation et inflammation

La 3-*O*-sulfatation est impliquée dans la régulation de l'inflammation *via* ses interactions avec l'AT-III mais aussi avec la cyclophiline B.

L'interaction entre les HS et l'AT-III a des conséquences indirectes sur l'inflammation, car elle bloque les réponses pro-inflammatoires induites par la thrombine et le facteur Xa. L'AT-III peut également agir directement sur le système immunitaire d'une manière dépendante des HS, et donc de la 3-*O*-sulfatation, pour diminuer la réponse inflammatoire (Wiedermann & Romisch, 2002). En ce sens, il a été montré que des souris déficientes en HS3ST1, qui présentaient une forte diminution du taux d'HS capables de lier l'AT-III, étaient plus sensibles au LPS. En effet, ce composé entraîne la mort de 60% des souris déficientes mais de seulement 30% des souris normales. Un prétraitement avec de l'AT-III augmente nettement la survie des souris normales, confirmant l'activité anti-inflammatoire dépendante des HS (Shworak *et al.*, 2010). De plus, la liaison de l'AT-III aux HS présents à la surface des leucocytes ou des cellules endothéliales entraîne la désactivation des récepteurs aux chimiokines, l'inhibition de la production du facteur tissulaire ou de certaines cytokines comme l'IL-6, et la production de prostacycline. De manière intéressante, l'héparine peut être utilisée comme agent compétiteur pour séquestrer l'AT-III et l'empêcher de se fixer aux HSPGs pour inhiber ses effets cellulaires (Wiedermann & Romisch, 2002).

Les cyclophilines (CyP) sont des protéines connues pour leur activité peptidyl-prolyl cis/trans isomérase et leur aptitude à interagir avec la cyclosporine A, un agent immunosuppresseur. Elles peuvent être sécrétées dans divers liquides biologiques, en réponse à un stimulus inflammatoire ou un stress oxydatif. Si les formes sécrétées de la CyPA et de la CyPB peuvent toutes deux entraîner la migration des lymphocytes T, monocytes/macrophages et éosinophiles, seule la CyPB permet l'induction d'une forte adhérence des cellules (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Allain *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2002 ; Melchior *et al.*, 2008).

Dans un premier temps, il a été montré que la CyPB interagissait avec ses cellules cibles par l'intermédiaire des HS membranaires, puisque leur élimination suite à un traitement avec les héparinases supprime la fixation de la CyPB sur des lymphocytes T humains (Denys *et al.*, 1998). Par la suite, il a été précisé que les chaînes HS requises pour l'interaction étaient portées par le syndécan-1 (Pakula *et al.*, 2006). La CyPB se lie en fait avec une forte affinité (Kd = 16 nM) à un motif correspondant au minimum à un octasaccharide contenant un résidu de GlcNS 3-*O*-sulfaté. L'invalidation de HS3ST3B chez des cellules Jurkat T (Vanpouille *et al.*, 2007) et de HS3ST2 dans les macrophages (Delos *et al.*, 2016) entraîne une diminution de la fixation de la CyPB et réduit les réponses induites dans les deux types de cellules.

D. Clairance de l'héparine circulante

Les stabiline-1 et -2 sont des récepteurs qui interviennent essentiellement dans la clairance de l'héparine circulante au niveau des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques. Leur activité est augmentée par la 3-*O*-sulfatation. En effet, il a été montré que l'endocytose d'oligosaccharides modifiés par HS3ST1 chez des cellules surexprimant les stabiline-1 et -2 est

plus efficace que celle d'oligosaccharides non modifiés. Par ailleurs, l'AT-III inhibe l'action des stabiline-1 et -2, ce qui suggère fortement qu'elles peuvent se lier aux mêmes motifs 3-*O*-sulfatés. De manière intéressante, les groupements 3-*O*-sulfates seraient reconnus par les stabilines au sein d'un décasaccharide, suggérant une spécificité de substrat relativement fine. D'ailleurs, la rétention de décasaccharides 3-*O*-sulfatés dans le foie de souris est similaire à celle de l'héparine, tandis que les décasaccharides dépourvus de groupement 3-*O*-sulfate sont moins retenus (Pempe *et al.*, 2012). Ainsi, même si elle n'est pas requise, la 3-*O*-sulfatation favorise la fonction des stabiline-1 et -2, probablement en augmentant leur affinité vis-à-vis de l'héparine et des chaînes HS.

E. Importance des HS 3-*O*-sulfatés dans le développement

Le rôle de la 3-*O*-sulfatation lors du développement chez l'Homme a été peu étudié. En effet, une seule étude a montré que la différenciation de cellules souches embryonnaires en cellules du mésoderme s'accompagnait de modifications de l'expression de certaines HS3STs. Le taux d'expression de HS3ST1 augmente ainsi d'un facteur 14 chez les cellules mésodermiques, tandis que l'expression des HS3ST2 et HS3ST6 est réduite 14 fois et 112 fois par rapport aux cellules souches. Le taux d'expression des HS3ST3A et HS3ST3B n'est pas modifié, mais celui des HS3ST4 et 5 diminue légèrement (Gasimli *et al.*, 2014). L'importance de 3-*O*-sulfatation a été plus étudiée en revanche lors du développement d'autres organismes tels que le nématode, la drosophile, le poisson zèbre et la souris.

L'organisme *Caenorhabditis elegans* exprime deux HS3STs, nommée HST3.1 et HST3.2, la première appartenant au type AT et la seconde appartenant au type gD. Il est connu que les HS sont nécessaires au développement normal du système nerveux chez le nématode (Kinnunen, 2014). Les HST3s, en revanche, ne seraient indispensables qu'au développement de certaines sous-populations de neurones. En effet, la perte de fonction de l'une ou l'autre des HST3 perturbe la formation des neurites et des branchements entre les neurones impliqués dans les fonctions sexuelles. De plus, HST3.2, mais pas HST3.1, serait impliquée dans la mise en place des neurites de la paire d'interneurones AIY, qui sont des neurones impliqués dans la perception de l'information thermique, en induisant l'expression d'une molécule d'adhérence nommée kal-1. De manière intéressante, l'expression de HST3.2 dans l'interneurone AIY n'est pas suffisante pour restaurer un phénotype sauvage chez un organisme dépourvu de HST3, tandis que sa réexpression dans les cellules voisines permet de retrouver un développement normal de l'interneurone AIY, suggérant donc que les HS 3-*O*-sulfatés agissent en trans dans ce cas (Teclé *et al.*, 2013). Ainsi, la 3-*O*-sulfatation n'a pas un rôle global sur le développement des cellules neuronales chez *Caenorhabditis elegans*, mais intervient dans des contextes très précis. La molécule kal-1 pourrait en fait être une HSBP dont la fixation à la surface cellulaire dépend de la présence de motifs 3-*O*-sulfatés.

A l'image de ce qui est décrit chez le nématode, il n'existe aussi chez la drosophile que deux HS3STs, HS3STA et HS3STB, la première étant apparentée au type AT et la seconde au type gD. Le rôle des HS3STs dans le développement de la drosophile est controversé (Kamimura *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2014a). Dans un premier temps, il a été montré qu'elles remplissaient des fonctions primordiales puisque la perte de fonction de l'une ou de l'autre conduit à une létalité importante aux stades embryonnaires ou larvaires. L'invalidation de l'expression de HS3STB par ARN interférence conduit à des anomalies de développement du système nerveux. De manière surprenante, elle a été associée à un défaut de signalisation de la voie Notch, quand bien même aucun des ligands de Notch n'a été décrit pour lier des HS 3-*O*-sulfatés. De plus, la perte de l'expression de HS3STB est corrélée à une diminution de l'expression de Notch, suggérant alors fortement que HS3STB est impliquée dans la mise en place de cette voie chez la drosophile (Kamimura *et al.*, 2004). Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux d'une étude ultérieure, montrant que des drosophiles HS3STB^{-/-} ne présentent pas de défaut de formation du système nerveux, ni de diminution de la signalisation de la voie Notch. Des résultats similaires ont d'ailleurs été observés chez les drosophiles doublement déficientes HS3STA^{-/-} et HS3STB^{-/-} (Guo *et al.*, 2014a). Des études supplémentaires seront nécessaires pour préciser le rôle de la 3-*O*-sulfatation dans le développement de la drosophile.

Chez le poisson zèbre, en plus d'être requise pour le développement de l'axe gauche-droite comme précédemment mentionné, la 3-*O*-sulfatation est nécessaire au développement du cœur. En effet, l'invalidation de l'expression de HS3ST7 conduit à des malformations cardiaques. Elle provoque notamment une diminution de l'expression de la tropomyosine 4 chez les cellules du myocarde, ce qui entraîne une diminution des capacités de contraction ventriculaire. L'expression de la tropomyosine 4 est régulée par BMP4, selon un mécanisme où les HS pourraient agir en trans. Les HS de l'endocarde, modifiés par HS3ST7, interagissent avec la protéine BMP4 et la présentent aux cellules myocardiques pour y induire la synthèse de tropomyosine 4. L'absence d'expression de HS3ST7 ne permet plus aux HS des cellules endocardiques d'interagir avec BMP4. La protéine n'est plus présentée au myocarde voisin, ce qui entraîne une diminution de synthèse de la tropomyosine 4 et donc une perte des capacités contractiles. La réexpression ubiquitaire de HS3ST7 permet de restaurer le phénotype normal (Samson *et al.*, 2013). Il s'agit de la première étude qui démontre que la 3-*O*-sulfatation influence l'activité d'une BMP.

Finalement, il a été montré que la différenciation de cellules souches embryonnaires de souris en cellules endodermiques primitives s'accompagnait d'une augmentation du taux global de la 3-*O*-sulfatation des HS, observée par cytofluorimétrie en flux grâce à l'utilisation de l'anticorps HS4C3. De manière cohérente, la différenciation des cellules souches s'accompagne

d'une augmentation de l'expression de HS3ST5. De plus, la surexpression de HS3ST5 induit le processus de différenciation même en présence d'un répresseur, tel que le facteur LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*). L'inactivation d'expression de HS3ST5 conduit en outre à une inhibition de la différenciation. Au niveau moléculaire, l'augmentation du nombre de motifs 3-*O*-sulfatés à la surface des cellules est associé à un recrutement de Fas au niveau des radeaux lipidiques, ce qui augmente sa signalisation. Cela étant, la manière dont les HS 3-*O*-sulfatés interviennent dans ce mécanisme est pour le moment inconnue (Hirano *et al.*, 2012).

II. Processus pathologiques associés à la 3-*O*-sulfatation

A. Rôles des HS 3-*O*-sulfatés dans les interactions hôte/pathogène

1. Infection par HSV-1

Les HS sont reconnus par diverses protéines virales lors de l'infection, mais la fixation d'une seule d'entre elles a été décrite pour être régulée par les HS 3-*O*-sulfatés. Il s'agit de la glycoprotéine gD, une protéine de l'enveloppe du virus HSV-1. Cette interaction est nécessaire au processus de fusion membranaire (Shukla *et al.*, 1999). Les motifs 3-*O*-sulfatés sont indispensables à l'entrée du virus puisque des cellules CHO sauvages, n'exprimant pas de HS3STs, sont résistantes à l'infection par HSV-1. Lorsqu'elles surexpriment les HS3ST2, 3A, 3B, 4, 5 et 6, elles peuvent en revanche être infectées par ce virus (Shukla *et al.*, 1999 ; Xia *et al.*, 2002 ; Tiwari *et al.*, 2005 ; Xu *et al.*, 2005 ; O'Donnell *et al.*, 2006). Les cellules qui produisent des HS 3-*O*-sulfatés *via* l'expression endogène de l'une de ces 6 enzymes sont toutes susceptibles d'être infectées par le virus. Par exemple, des fibroblastes primaires de cornée humaine sont sensibles à l'infection par HSV-1 (Tiwari *et al.*, 2006). En outre, l'interaction entre la protéine gD et les HS 3-*O*-sulfatés n'est pas seulement impliquée dans les premières étapes de l'infection par HSV-1. En se liant à des motifs 3-*O*-sulfatés à la surface des macrophages, la protéine gD est présentée au récepteur HVEM, ce qui conduit à l'activation de voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire. En se fixant sur des motifs HS similaires à la surface des macrophages, la CyPB induit les mêmes réponses cellulaires *via* HVEM, ce qui suggère que le virus pourrait détourner des voies existantes pour favoriser sa survie dans ce type cellulaire (Delos *et al.*, 2016).

L'élimination des HS de surface par l'utilisation d'héparinases ou bien l'ajout de fragments exogènes de HS modifiés par HS3ST3A ou HS3ST5 permet d'inhiber la fusion membranaire. Cependant, lorsque les HS ajoutés ont été modifiés par HS3ST1, l'interaction avec la protéine gD n'est pas bloquée, suggérant que ces HS ne sont pas capables d'interagir avec la protéine gD (Tiwari *et al.*, 2004). Par ailleurs, la surexpression de HS3ST1 en cellules COS-7 ne rend pas les cellules sensibles à l'infection par HSV-1. La surexpression d'une protéine chimère composée de la région N-terminale de HS3ST3A et du domaine

sulfotransférase de HS3ST1 ne conduit pas non plus à la synthèse de HS se liant à la protéine gD, montrant que la spécificité de substrat ne dépend pas de la région N-terminale (Yabe *et al.*, 2001). Même si certaines HS3STs de types gD peuvent synthétiser des HS anticoagulants, le fait que HS3ST1 ne soit pas capable de générer le motif de fixation de la protéine gD confirme les différences fonctionnelles existantes entre les deux sous-groupes de HS3STs. Il a alors été proposé que des octasaccharides modifiés par les HS3STs de type gD pouvaient être utilisés en thérapie (Copeland *et al.*, 2008).

La présence des groupements 3-*O*-sulfates augmente l'affinité de la protéine gD pour les HS d'un facteur 20 (Thacker *et al.*, 2014). A l'image de ce qui a été réalisée pour déterminer la structure du motif de liaison à l'AT-III, une forme recombinante de la protéine gD a été utilisée pour purifier des oligosaccharides 3-*O*-sulfatés. Il a ainsi été établi que le motif héparine de liaison minimal de la protéine gD aux HS correspondait à un octasaccharide comprenant un résidu de GlcNH₂ qui porte un groupement 3-*O*-sulfate : UA-GlcNS-IdoUA2S-GlcNAc-UA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNH₂**3S6S** (Liu *et al.*, 2002). Cependant, ce motif n'est pas unique et il a été proposé que la protéine gD pouvait interagir avec d'autres fragments de HS. Par exemple, il peut s'agir d'un octasaccharide de structure UA2S-GlcNS6S-IdoUA2S-GlcNS6S-IdoUA2S-GlcNS**3S6S**-IdoUA2S-GlcNS6S (Copeland *et al.*, 2008). De plus, la protéine gD peut aussi interagir avec des oligosaccharides synthétiques 3-*O*-sulfatés, puisque de telles molécules peuvent bloquer l'infection par HSV-1 (Hu *et al.*, 2011). Des études de mutagenèse et de cristallographie ont montré que le site d'interaction avec les HS se situait au niveau de la partie N-terminale de la protéine gD (Carfi *et al.*, 2001 ; Yoon *et al.*, 2003).

2. Infection par d'autres pathogènes

Si aucune autre protéine de pathogène n'a été caractérisée pour interagir avec les groupements 3-*O*-sulfates, il semble pourtant que HSV-1 ne soit pas le seul agent pathogène à utiliser les HS 3-*O*-sulfatés présents à la surface cellulaire lors de l'infection. Par exemple, les gènes codant HS3ST3A et 3B sont localisés dans une région chromosomique non loin de celle portant des gènes de susceptibilité à l'infection par *Plasmodium chabaudi* chez la Souris, suggérant que les deux enzymes pourraient influencer la sensibilité de la souris à ce micro-organisme. Chez l'Homme, des SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) dans les gènes *HS3ST3A* et *HS3ST3B* ont été associées à une augmentation de la sensibilité à *Plasmodium falciparum* (Atkinson *et al.*, 2012 ; Nguyen *et al.*, 2018). Il a également été observé que la transmission du VIH d'une mère à son enfant était favorisée par l'existence d'un SNP au sein du gène codant HS3ST3A (Joubert *et al.*, 2010). A l'inverse, une étude suggère que les HS3STs pourraient avoir un rôle protecteur des cellules hôtes vis-à-vis des pathogènes. En effet, il a été montré que l'expression de HS3ST3B était diminuée chez des hépatocytes infectés par le virus de l'hépatite B de manière chronique. La surexpression de l'enzyme dans ces cellules

entraîne l'inhibition de la réplication du virus de l'hépatite B, le mécanisme sous-jacent restant inconnu (Zhang *et al.*, 2010).

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

S'il est bien connu que les HS sont impliqués dans le développement de pathologies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, l'implication de la 3-O-sulfatation n'est pas établie. Il a récemment été montré que les niveaux des transcrits de HS3ST2 et HS3ST4 augmentaient dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie. En outre, les HS 3-O-sulfatés interagissent avec la protéine Tau à l'intérieur de la cellule et favorisent sa phosphorylation anormale. L'inhibition de l'expression de HS3ST2 chez un modèle de tauopathie du poisson zèbre entraîne la restauration du profil normal de phosphorylation de Tau, aussi bien dans la moelle épinière que dans le cerveau, ce qui permet de restaurer la taille des axones. Ces résultats suggèrent que les HS 3-O-sulfatés pourraient jouer un rôle clé dans la progression de la maladie d'Alzheimer (Sepulveda-Diaz *et al.*, 2015). La 3-O-sulfatation pourrait aussi contribuer à l'évolution de la maladie d'Alzheimer en favorisant la formation des plaques amyloïdes. En effet, il a été observé, grâce à l'utilisation d'anticorps reconnaissant des épitopes spécifiquement sulfatés, que la présence de motifs 3-O-sulfatés était plus importante au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe chez les patients atteints de la maladie. Or, c'est dans ces régions que s'accumulent les peptides A β en conditions pathologiques (Bruinsma *et al.*, 2010).

C. Les HS3STs et le cancer

Le rôle de la 3-O-sulfatation dans les processus cancéreux est pour le moment incompris, les données disponibles étant contradictoires. En effet, tandis que certains travaux suggèrent que ces enzymes pourraient avoir des fonctions anticancéreuses, d'autres études indiquent que les HS 3-O-sulfatés pourraient, au contraire, favoriser la progression tumorale.

1. Les HS3STs, des facteurs protecteurs antitumoraux

Les résultats de plusieurs études indiquent que les HS3STs pourraient jouer le rôle de facteurs antitumoraux, les HS3STs étant très peu exprimées voire totalement absentes des cellules cancéreuses. L'analyse de biopsie prélevées chez des patientes atteintes de carcinome canalaire invasif, le cancer du sein le plus fréquent, a montré que l'expression des HS3ST4, HS3ST5 et HS3ST6 diminuait d'un facteur 8 à 10 dans les tumeurs non-métastatiques par rapport aux tissus sains. Dans les tumeurs métastatiques, l'expression de HS3ST4 est diminuée d'un facteur 30, mais celle de HS3ST5 n'est pas modifiée (Fernandez-Vega *et al.*, 2013).

Les gènes codant HS3ST1, HS3ST2, HS3ST3A et HS3ST6 sont retrouvés hyper-méthylés chez une lignée cellulaire de chondrosarcome. L'utilisation d'un inhibiteur des méthyltransférases conduit à la restauration de leur expression et est associée à une

diminution de la prolifération des cellules et de leurs capacités migratoires. La surexpression de HS3ST3A conduit aux mêmes effets tandis que la surexpression de HS3ST1 n'a qu'un effet anti-migratoire (Bui *et al.*, 2010). De même, *HS3ST2* est hyper-méthylé dans des lignées de cellules de cancers du poumon, du sein et du pancréas (Miyamoto *et al.*, 2003 ; Hwang *et al.*, 2013). Comme précédemment, la restauration de l'expression de l'enzyme par un traitement avec un inhibiteur des méthyltransférases ou sa surexpression conduisent à une diminution de la prolifération, de l'invasion et de la migration cellulaires. L'invalidation de l'expression de *HS3ST2* conduit en outre à une augmentation de ces processus cellulaires (Hwang *et al.*, 2013).

De manière intéressante, le gène codant *HS3ST2* a été retrouvé hyper-méthylé dans des biopsies provenant de patients atteints de cancers du sein, du col de l'utérus, du côlon, du pancréas et du poumon (Miyamoto *et al.*, 2003 ; Shivapurkar *et al.*, 2007 ; Hwang *et al.*, 2013 ; Kassim *et al.*, 2017). Le cas de patients atteints de cancer de la prostate est différent, puisque la méthylation du promoteur de *HS3ST2* n'a été observé que dans des biopsies prélevées chez des patients présentant des formes récurrentes après ablation de la prostate (Mahapatra *et al.*, 2012). L'hyper-méthylation de *HS3ST2* a en outre été observée dans les cellules B et T de patients atteints de lymphomes, mais aussi dans le cas de leucémie myéloïde aigüe (Jiang *et al.*, 2009 ; Martin-Subero *et al.*, 2009). Elle a d'ailleurs été corrélée à une augmentation de l'expression du Ki67 dans les biopsies de tumeurs pulmonaires. Ces derniers résultats suggèrent que l'hyper-méthylation du gène codant *HS3ST2* entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire (Hwang *et al.*, 2013). Une étude statistique réalisée grâce au suivi de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules a montré que l'établissement d'une corrélation entre l'état de méthylation de *HS3ST2* et la survie des patients n'était pas toujours possible et dépendait de l'état d'avancement de la maladie. En effet, lorsque les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints, l'hyper-méthylation de *HS3ST2* est associée à un faible taux de survie. En revanche, il n'existe pas de corrélation entre la méthylation de *HS3ST2* et la survie des patients lorsque les ganglions sont envahis. Les auteurs soulignent toutefois qu'en raison de la faible taille de l'échantillon de patients étudiés, des études à plus grand échelle seront nécessaires pour conclure quant à un lien entre l'état de méthylation de *HS3ST2* et la survie des patients (Hwang *et al.*, 2013). Considérant la globalité de ces études, il a été proposé que la méthylation du gène codant *HS3ST2* pourrait servir de biomarqueur, dans le but de détecter précocement le cancer du col de l'utérus ou bien d'analyser les possibilités de récurrence du cancer de la prostate (Shivapurkar *et al.*, 2007 ; Mahapatra *et al.*, 2012).

Dans leur ensemble, ces données sont tout de même en faveur d'un rôle antitumoral des HS3STs dans les cellules cancéreuses. Elles suggèrent en effet que l'augmentation de

l'expression et de l'activité des HS3STs pourraient servir de cibles thérapeutiques chez les patients souffrant de différentes formes de cancers. Cela étant, la majorité de ces travaux portent sur le gène et non sur l'enzyme à proprement parler, et les objectifs de recherche sont d'observer la méthylation des gènes. Si le gène codant HS3ST2 est souvent retrouvé hyperméthylé dans différents types de cancers, il n'est que rarement fait état de l'hyper-méthylation des gènes codant les autres HS3STs. De plus, la distribution tissulaire de HS3ST2 est relativement restreinte puisque l'enzyme est essentiellement exprimée dans le système nerveux. Ainsi, le fait qu'elle ne soit pas présente dans les tissus cancéreux prélevés n'est pas surprenant puisqu'elle n'est pas présente dans les mêmes tissus sains. Il semble cependant que la régulation négative de son expression soit encore plus forte dans les tissus cancéreux, et c'est la raison pour laquelle l'état de méthylation de *HS3ST2* pourrait servir de marqueur. Par ailleurs, pour conclure quant à un effet des HS3STs sur la progression tumorale, il reste à déterminer si les modifications de l'expression des HS3STs dans ces biopsies sont associées à des modifications structurales des HS de surface par rapport aux tissus sains. Enfin, la régulation de l'expression des HS3STs par méthylation de l'ADN en condition physiologique n'est pour le moment pas connue.

2. Les HS3STs en tant que facteurs pro-cancéreux

A l'inverse, plusieurs études suggèrent que les HS3STs pourraient remplir des fonctions pro-cancéreuses. Les procédures expérimentales diffèrent puisqu'il s'agit essentiellement de l'analyse des effets de la surexpression des HS3STs en utilisant différents modèles de cellules cancéreuses.

Ainsi, les effets induits par la surexpression de HS3ST2 ont été étudiés chez les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 (Vijaya-Kumar *et al.*, 2014). Ces deux lignées diffèrent par leur signature moléculaire. Les premières sont des cellules dites triples-négatives, qui n'expriment ni le récepteur HER2 de la famille des récepteurs EGFR, ni les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone. Les secondes, de type *luminal A*, expriment les deux récepteurs aux hormones mais sont également dépourvues du récepteur HER2. Étonnamment, les réponses cellulaires induites par la surexpression de HS3ST2 diffèrent entre ces deux lignées. La prolifération, la motilité et les propriétés migratoires et invasives des cellules MDA-MB-231 exprimant HS3ST2 sont augmentées. Ces cellules sécrètent notamment des quantités supérieures de MMP et présentent un changement dans le profil d'expression de molécules impliquées dans l'adhérence cellulaire, telles que la E-cadhérine. Elles présentent également une augmentation de l'activation des voies ERK et Wnt/ β -caténine. À l'inverse, la prolifération et les capacités invasives des cellules MCF-7 qui surexpriment HS3ST2 sont réduites, et ne présentent pas de suractivation des voies de signalisation. Ces résultats

suggèrent que les effets des HS3STs pourraient dépendre de la signature moléculaire des cellules cancéreuses.

Les premiers travaux suggérant un effet pro-tumoral des HS3STs ont été réalisés par Song *et al.* en 2011. Les auteurs ont montré que le traitement d'une lignée de cellules de cancer du pancréas avec un inhibiteur des HDAC (*Histone Deacetylase*) entraîne une augmentation de l'expression de HS3ST3B. Ces données indiquent par ailleurs que l'expression de l'enzyme est susceptible d'être régulée par des mécanismes de compaction/décompaction de la chromatine à la différence de celle de HS3ST2 qui semble dépendre de la méthylation des îlots CpG. L'augmentation de l'expression de HS3ST3B est associée à des modifications morphologiques des cellules, qui deviennent alors allongées, et à une augmentation de leurs capacités migratoires. De plus, l'injection de cellules de cancer du pancréas surexprimant HS3ST3B chez des souris donne lieu à l'apparition de tumeurs exprimant fortement la vimentine mais faiblement la E-cadhérine. Ces résultats donnent à penser que HS3ST3B pourrait être impliquée dans l'induction de la TEM chez des cellules de cancer du pancréas. Par la suite, l'étude de biopsies prélevées chez des patients souffrant de cancer du poumon non à petites cellules a montré que l'expression de HS3ST3B est plus élevée que chez les tissus sains. Elle est encore plus élevée chez les cellules cancéreuses de ces biopsies qui présentent un phénotype mésenchymateux par rapport à celles qui présentent un phénotype épithélial, confirmant alors la potentielle implication de l'enzyme dans l'induction de la TEM (Zhang *et al.*, 2018). Il a également été montré que la surexpression de HS3ST3B dans des lignées leucémiques entraînait une augmentation de la prolifération cellulaire et des capacités invasives des cellules *in vitro*, mais aussi de la croissance des tumeurs *in vivo*. Le mécanisme sous-jacent impliquerait le VEGF et une augmentation de l'activation des voies Akt et ERK (Zhang *et al.*, 2015).

Enfin, l'étude des effets relatifs à l'expression de HS3ST4 a été abordée de manière empirique. L'injection chez la souris de cellules de cancéreuses surexprimant TRF2 (*Telomere Repeats Binding Factor 2*), une protéine impliquée dans la stabilisation des télomères, entraîne une diminution du recrutement et de l'activation des cellules NK sur le lieu des tumeurs. Le même phénomène a été observé dans des biopsies prélevées chez des patients atteints de cancer du côlon. L'étude du mécanisme sous-jacent a montré que TRF2 se liait au gène codant HS3ST4 et induisait une augmentation de l'expression de l'enzyme chez des fibroblastes tumoraux. L'invalidation de l'expression de TRF2 chez ces cellules entraîne une chute des niveaux d'expression de HS3ST4. De plus, la seule invalidation de l'expression de HS3ST4 chez ces cellules ou bien l'invalidation simultanée de HS3ST4 et de TRF2 conduisent aux mêmes effets et entraînent des augmentations comparables du recrutement et de l'activation des

cellules NK. Ces résultats montrent donc que c'est HS3ST4 qui est responsable de l'inhibition de l'activité des cellules NK (Birrocio *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces données indique que les HS3STs pourraient conférer aux cellules cancéreuses plusieurs gains de fonctions favorisant leur expansion, en améliorant notamment la prolifération cellulaire, mais aussi les capacités migratoires des cellules. Elles pourraient en outre participer à l'induction de la TEM et être impliquées dans l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire. Pourtant, le faible nombre d'études disponibles constitue la première limite quant à l'établissement de conclusions. Si les travaux de surexpression réalisés *in vitro* et *in vivo* convergent vers une même tendance, il faudrait qu'ils soient confirmés par plusieurs autres travaux, mais aussi et surtout par l'étude de l'expression des HS3STs dans de plus nombreuses biopsies prélevées chez des patients atteints de différents types de cancer.

3. Les HS3STs, des facteurs régulateurs de la progression tumorale

Une dernière étude suggère que la fonction pro ou anticancéreuse des HS3STs dans le cancer du sein pourrait dépendre de la signature moléculaire des cellules. Les effets induits par la surexpression de HS3ST3A semblent également dépendre du sous-type moléculaire et plus particulièrement de la présence du récepteur HER2. En effet, des travaux réalisés *in vitro* montrent que la surexpression de HS3ST3A chez des cellules n'exprimant pas HER2 que sont les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 entraîne une diminution de la prolifération cellulaire, tandis que lorsqu'elle est surexprimée chez les cellules SKBR3, qui sont HER2+, la prolifération cellulaire est augmentée. La surexpression de HS3ST3A en cellules MCF-7 est associée à une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques. Ces effets sont retrouvés *in vivo* puisque l'injection de cellules MCF-7 exprimant HS3ST3A chez des souris conduit à la formation de tumeurs dont la croissance est retardée par rapport à celles formées à partir de cellules parentales. En outre, l'étude d'une cohorte de patientes souffrant de différents types de cancer du sein a montré que, de manière cohérente avec les travaux réalisés *in vitro*, l'expression de HS3ST3A était relativement faible dans les tumeurs de type luminal A, mais significativement plus importante au sein des tumeurs de type HER2+. L'expression du récepteur HER2 a d'ailleurs été corrélée à une taille plus importante des tumeurs, à l'envahissement des ganglions, mais aussi à un faible taux de survie des patientes (Mao *et al.*, 2016).

L'étude de Vijaya-Kumar *et al.* montrait déjà en 2014 que le rôle des HS3STs pouvait dépendre du sous-type moléculaire. Cependant, cette étude suggérait que, selon le contexte, les HS3STs pouvaient tour à tour exercer une fonction pro-tumoral ou bien ne pas avoir d'effet sur le développement des cellules cancéreuses. Les travaux de Mao *et al.* (2016) indiquent que le sous-type moléculaire des cellules de cancer du sein pourrait avoir plus d'impact et faire

des HS3STs tantôt des facteurs protecteurs de tumeur dans le cas de cancers du sein de type luminal A, tantôt des enzymes pro-tumorales lorsque les cellules cancéreuses expriment HER2.

L'ensemble des études concernant les potentielles fonctions des HS3STs dans le cancer laisse entrevoir des résultats contradictoires qui mettent en lumière le fait que la littérature manque cruellement de données à ce sujet. Assurément, d'autres travaux seront nécessaires pour mieux définir le rôle des HS3STs dans les processus cancéreux.

Objectifs du travail de thèse

Les héparanes sulfates (HS) jouent un rôle primordial dans les mécanismes physiopathologiques en raison de leur capacité à interagir avec de nombreux médiateurs protéiques. Toute la complexité de l'étude des HS provient du fait que la spécificité d'interaction avec leurs ligands dépend de leur extrême diversité structurale. Pendant leur biosynthèse, ils subissent une phase de maturation au cours de laquelle ils sont largement modifiés par l'action séquentielle et coordonnée d'une épimérase et de plusieurs sulfotransférases. Le degré de modification et plus particulièrement l'arrangement des sulfates est ainsi dicté par l'expression des différentes enzymes impliquées dans cette phase de maturation. Un degré supplémentaire de complexité est lié au fait que ces acteurs de la maturation des HS sont représentés pour la plupart par plusieurs isoenzymes qui présentent des spécificités de substrat et des distributions tissulaires qui leur sont propres. Les HS produits par un type cellulaire peuvent donc différer structurellement de ceux produits par un type cellulaire voisin, ou pour le même type cellulaire, selon les conditions environnementales. Il est ainsi probable que ces différents HS présentent des propriétés biologiques distinctes. Dans des situations pathologiques telles que le cancer, l'expression des enzymes de biosynthèse de HS est largement modifiée, ce qui conduit à un dérèglement de leurs propriétés biologiques. Etant donné leur implication dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la migration ou de l'adhérence cellulaires en conditions physiologiques, il n'est pas étonnant que la modification de leur structure engendre une dérégulation de ces processus chez les cellules cancéreuses. De manière plus fine, les modifications d'expression au sein de chaque famille d'enzymes de modification des HS pourrait avoir des impacts différents dépendants de l'enzyme impliquée mais aussi du type de cancer.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à la 3-*O*-sulfatation des HS, étape réalisée par les HS 3-*O*-sulfotransférases (HS3STs) dont on dénombre sept isoenzymes chez l'Homme. Son rôle dans le cancer est encore mal connu, les données disponibles à ce sujet étant contradictoires. En effet, certains travaux suggèrent que les HS3STs pourraient être des suppresseurs de tumeur, quand d'autres études donnent à penser que la 3-*O*-sulfatation pourrait favoriser la progression tumorale. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été de contribuer à une meilleure compréhension de la fonction des HS3STs dans les mécanismes cellulaires associés au cancer.

Dans un premier temps, nous nous sommes posé les questions suivantes : **Les HS3STs ont-elles des propriétés protectrices antitumorales ou sont-elles au contraire des facteurs de promotion des tumeurs ? Les différentes isoenzymes peuvent-elles induire des réponses différentes dans un même modèle cellulaire ? Quels sont les mécanismes moléculaires sous-jacents à leur action ?** Pour y répondre, nous avons analysé les effets induits par la surexpression transitoire des HS3ST2, 3A, 3B et 4 dans les

lignées cellulaires de cancer du sein MDA-B-231 et BT-20 sur la prolifération, la viabilité et la survie cellulaires.

Forts de nos observations, nous avons voulu dans un second temps approfondir l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents. Nous ignorions au début de ce travail l'existence de protéines membranaires potentiellement impliquées dans des interactions avec les HS 3-*O*-sulfatés, avant que la neuropiline-1 ne soit identifiée comme un de ces ligands probables. Or, cette protéine membranaire est connue de longue date pour être un co-récepteur de nombreux facteurs de croissance impliqués dans la transduction de signaux de prolifération et de survie des cellules cancéreuses.

Nous avons donc voulu répondre aux questions suivantes : **Les effets cellulaires induits par la surexpression des HS3STs nécessitent-ils l'intervention de la neuropiline-1 ? La surexpression des HS3STs induit-elle l'activation de voies qui sont impliquées dans d'autres effets cellulaires que la prolifération et la survie cellulaires ?** Pour analyser la participation de la neuropiline-1 dans les effets pro-tumoraux des HS3STs, nous avons généré des clones cellulaires exprimant stablement HS3ST3B à partir de la lignée MDA-MB-231. Nous avons ensuite procédé à des expériences d'inactivation d'expression de la neuropiline-1, afin d'étudier son rôle dans les avantages accordés par la surexpression de HS3ST3B dans les cellules cancéreuses. Finalement, nous avons utilisé les cellules surexprimant stablement HS3ST3B pour analyser plus en détail l'activation des voies associées à la progression tumorale.

Travaux personnels

PARTIE 1 : CARACTERISATION DES EFFETS INDUITS PAR LES HS3STs CHEZ LES CELLULES DE CANCER DU SEIN MDA-MB-231

I. Introduction

Bien que le rôle de cette modification dans les processus cancéreux ait fait l'objet de plusieurs études, il est pour le moment incompris, les données disponibles à ce sujet étant contradictoires.

Certains travaux suggèrent que ces enzymes pourraient avoir des fonctions anticancéreuses. En effet, il a été montré que l'expression de certaines HS3STs était diminuée dans le cancer du sein, suggérant que la présence des enzymes nuisait à la progression tumorale (Fernandez-Vega *et al.*, 2013). De plus, il a été décrit que les gènes codant HS3ST2, mais également HS3ST1, HS3ST3A et HS3ST6 étaient méthylés de manière aberrante dans divers types de cancers, aussi bien en lignées cellulaires que dans des biopsies (Miyamoto *et al.*, 2003 ; Shivapurkar *et al.*, 2007 ; Jiang *et al.*, 2009 ; Martin-Subero *et al.*, 2009 ; Bui *et al.*, 2010 ; Hwang *et al.*, 2013 ; Mao *et al.*, 2016 ; Kassim *et al.*, 2017). La restauration de l'expression de ces enzymes dans les lignées cellulaires testées entraîne d'ailleurs une diminution de la prolifération et de l'invasion cellulaires (Bui *et al.*, 2010 ; Hwang *et al.*, 2013).

A l'inverse, d'autres études indiquent que les HS 3-*O*-sulfatés pourraient favoriser la progression tumorale. En ce sens, il a été montré que l'expression de HS3ST2 était associée à une augmentation de la prolifération et de l'invasion de cellules de cancer du sein (Vijaya-Kumar *et al.*, 2014). De même, HS3ST3B augmente la prolifération et la viabilité cellulaires, mais induit aussi la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Zhang *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2018). Enfin, HS3ST4 pourrait exercer une action pro-tumorale en protégeant les cellules cancéreuses de l'action du système immunitaire (Birrocio *et al.*, 2013).

Bien que le rôle des HS3STs soit pour le moment controversé, ces études indiquent tout de même que les modifications de l'expression des HS3STs chez les cellules cancéreuses changent leur comportement. Par ailleurs, si les fonctions de différentes HS3STs ont été étudiées, aucune étude n'a analysé les effets de l'expression de plusieurs HS3STs dans le même modèle cellulaire. Il est en effet probable que les réponses qu'elles induisent varient. De plus, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à définir. Dans ce contexte, nous avons étudié les effets induits par la surexpression des HS3ST2, HS3ST3A, HS3ST3B et HS3ST4 sur la prolifération et la viabilité des lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et BT-20. Nous avons ensuite analysé l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire. Enfin, nous avons testé l'impact de l'expression de ces enzymes dans la résistance des cellules à l'apoptose induite par des agents pro-apoptotiques et par les cellules NK.

II. Publication

“The heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferases (HS3ST) 2, 3B and 4 enhance proliferation and survival in breast cancer MDA-MB-231 cells”

Charles Hellec¹, Maxime Delos¹, Mathieu Carpentier¹, Agnès Denys¹, Fabrice Allain^{1*}

¹University of Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France

*Corresponding author: fabrice.allain@univ-lille1.fr (FA)

Abstract

Heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferases (HS3STs) catalyze the final maturation step of heparan sulfates. Although seven HS3ST isozymes have been described in human, 3-*O*-sulfation is a relatively rare modification, and only a few biological processes have been described to be influenced by 3-*O*-sulfated motifs. A conflicting literature has recently reported that HS3ST2, 3A, 3B and 4 may exhibit either tumor-promoting or anti-oncogenic properties, depending on the model used and cancer cell phenotype. Hence, we decided to compare the consequences of the overexpression of each of these HS3STs in the same cellular model. We demonstrated that, unlike HS3ST3A, the other three isozymes enhanced the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 and BT-20 cells. Moreover, the colony forming capacity of MDA-MB-231 cells was markedly increased by the expression of HS3ST2, 3B and 4. No notable difference was observed between the three isozymes, meaning that the modifications catalyzed by each HS3ST had the same functional impact on cell behavior. We then demonstrated that overexpression of HS3ST2, 3B and 4 was accompanied by increased activation of c-Src, Akt and NF- κ B and up-regulation of the anti-apoptotic proteins survivin and XIAP. In line with these findings, we showed that HS3ST-transfected cells are more resistant to cell death induction by pro-apoptotic stimuli or NK cells. Altogether, our findings demonstrate that HS3ST2, 3B and 4 share the same pro-tumoral activity and support the idea that these HS3STs could compensate each other for loss of their expression depending on the molecular signature of cancer cells and/or changes in the tumor environment.

Keywords: heparan sulfate, sulfotransferase, cancer, survival, signal transduction, apoptosis

Introduction

Heparan sulfate (HS) is a highly sulfated glycosaminoglycan found at the cell surface and in the extracellular matrix. It mediates cell-cell and cell-matrix communications and regulates the binding of a large number of ligands, resulting in a variety of physiological and pathological effects, such as in embryonic development, cell growth and differentiation, homeostasis, inflammatory response, tumor growth and microbial infection. These interactions are driven at a first electrostatic level by the overall sulfation of HS, and then by the specific recognition of structural determinants, especially the specific arrangement of sulfate groups in a given sequence [1,2].

The structural diversity in HS is derived from enzymatic modifications of the nascent polymer composed of alternating D-glucuronic acid (GlcUA) and N-acetylated D-glucosamine (GlcNAc) units. This 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 (S-domains), regions that escape modification and remains N-acetylated, and regions of transition alternating N-acetylated and N-sulfated units. The further modifications include C5 epimerization of some GlcUA into L-iduronic acid (IdoUA), 2-*O*-sulfation of uronic acid residues -mainly IdoUA- and 6-*O* and/or 3-*O*-sulfation of GlcN units. These modifications are catalyzed by HS maturation enzymes, including N-deacetylases/N-sulfotransferases (NDST), C5-epimerase and 2-*O*, 6-*O* and 3-*O*-sulfotransferases (HS2ST, HS6ST, HS3ST). To date, four NDSTs, three HS6STs and seven HS3STs have been cloned and characterized in human. These isozymes are expressed in a different way depending on cell type and tissue environment, which renders the schema of HS maturation more complex [2,3]. Although HS3STs represent the largest family of HS sulfotransferases, the reaction of 3-*O*-sulfation is the rarest modification found within HS compared to the widely distributed N-, 6-*O*-GlcN and 2-*O*-UA sulfations. Moreover, it is the last modification in HS biosynthesis, which requires that the substrates for HS3STs have been already modified at other positions by NDSTs, HS2ST and C5-epimerase [4,5]. HS3ST1 was described to transfer a sulfate group to the 3-OH position of N-sulfated GlcN (GlcNS) residue that is linked to a non-sulfated GlcUA residue at the non-reducing side, while HS3ST5 exhibits a broader substrate specificity and transfers a sulfate group to GlcNS linked to either GlcUA or IdoUA irrespective of 2-*O*-sulfation. Both these isozymes are critically involved in the generation of anticoagulant-active HS/heparin domains, as they participate in the synthesis of the binding site for antithrombin-III (AT-III). In contrast, HS3ST2, 3A, 3B, 4 and 6 introduce a sulfate group to the 3-OH position of GlcNS residue that is linked to an adjacent upstream 2-*O*-sulfated IdoUA. These isozymes, which are also called "gD-type" HS3STs, were reported to provide the HS-binding site for the protein gD of type I herpes simplex virus (HSV-1) and to assist viral entry [6-12]. It is also worth noting that

hundreds HS-binding proteins have been identified, but only a little number of ligands are known to have a specific affinity for 3-*O*-sulfated HS sequences [5,13]. In this context, compared to the other HS modifications, 3-*O*-sulfation emerge as a structural determinant insuring selective interactions.

The functions of 3-*O*-sulfated HS in the regulation of physiological and pathological processes have gained a growing interest in recent years. In addition to its well-defined role in the anti-coagulant properties of HS/heparin, 3-*O*-sulfation has been reported to play a critical role in cancer. These assumptions are based on the observations that tumor cell behavior is dramatically altered by the expression of gD-type HS3STs. As examples, HS3ST2 was reported to be critically involved in breast cancer cell invasiveness [14]; high expression of HS3ST3B induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells [15] and promotes the proliferation of acute myeloid leukemia cells [16]; the pathological expression of HS3ST4 plays a deleterious role in the escape of cancer cells to the immune system [17]. On the other hand, a conflicting literature has suggested that some of these isozymes may exhibit anti-oncogenic properties. Aberrant methylation of the genes encoding HS3ST2 and HS3ST3A was indeed described in various cancers. Reversing methylation restored the expression of both these HS3STs and resulted in the suppression of tumor cell growth [18-21]. More recently, HS3ST3A was described as a tumor regulator in the development of breast cancer, with contrasting anti-oncogenic or tumor-promoting effects depending on the phenotype of cancer cells [22]. Although contradictory, all these studies suggest that abnormal expression of certain gD-type HS3STs may have a functional impact on cancer cell behavior. However, the effects of individual expression of one isozyme compared with the others and the molecular mechanisms underlying these effects remain still largely unknown. Hence, we decided to evaluate the consequences of an overexpression of HS3ST2, 3A, 3B and 4 in the same cellular model. To this end, we carried out a comparative study of the responses induced by the expression of each isozyme in the breast cancer cell line MDA-MB-231. Overall, we found that HS3ST2, 3B and 4 enhance cell proliferation and promote efficient protection against cell death, which suggests that the three isozymes may display a prominent role in breast cancer progression.

Materials and methods

Materials

Rabbit antibody to HS3ST2 and mouse antibody to HS3ST3A (clone E-12) were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) and Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), respectively. Mouse antibodies to HS3ST3B, HS3ST4 and survivin were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Antibodies to phospho-Akt(S473), Akt, phospho-

c-Src(Y416), c-Src, phospho-ERK1/2(T202/Y204), phospho-STAT3(Y705), STAT3, I-κB, phospho-NF-κB p65(S536), NF-κB p65, XIAP and secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Mouse antibody to GAPDH was from Santa Cruz. HS4C3 and MBP49 antibodies were provided by T. Van Kuppevelt (University of Nijmegen, Netherlands) and used as described in [23]. Other chemicals and antibodies, including anti-ERK1/2, were from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) unless otherwise specified.

Construction of expression plasmids

The cDNA sequences encoding human HS3ST2 (NM_006043) and HS3ST3A (NM_006042) were obtained from primary macrophages, while the encoding region for HS3ST3B (NM_006041) was isolated from the fibroblast MRC-5 SV2 cell line [24,25]. Each cDNA was amplified by PCR with specific forward and reverse primers (Table 1) and DynaZyme DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), as described by the manufacturer. PCR fragments were generated with NheI or XhoI restriction sites at the 5' end and XhoI or BamHI at the 3' end. After digestion with the appropriate restriction enzymes, fragments were inserted in pcDNA3.1. Expression plasmid encoding HS3ST4 (NM_006040) was constructed as described in [17] and provided by J. Cherfils-Vicini (University of Nice, France). Subsequently, the coding DNA sequence (CDS) was inserted in pcDNA3.1 using NheI and XhoI restriction sites. Each construct was sequenced by GATC Biotech AG (Constance, Germany) to verify the cDNA sequence and the insert positions.

Table 1. Sets of primers used for plasmid construction.

The underlined sequences represent restriction sites for the generation of PCR fragments.

Enzymes	Forward (F) and reverse (R) primers
HS3ST2	F: 5'-ATATGATATCGCCACCATGGCCTATAGGGTCTGGGCCGCG-3' R: 5'-GTCCAAGCTTTTATCCCACCTGAAGTCCTGCCAAC-3'
HS3ST3A	F: 5'-ATATCTCGAGGCCACCATGGCCCCTCCGGGCCCGGCCAGRG-3' R: 5'-GTCCGGATCCTTATCCATCCCAGCCAAAGTCGTGCCCGGTC-3'
HS3ST3B	F: 5'-ATATCTCGAGGCCACCATGGCCCCTCCGGGCCCGGCCAGRG-3' R: 5'-GTCCGGATCCTTATCCATCCCAGCCAAAGTCGTGCCCGGTC-3'

Cell culture and transfection

The human breast cancer cell lines MDA-MB-231 cells (ATCC® HTB-26™) and BT-20 cells (ATCC® HTB-19™) were routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Lonza, Verviers, Belgium), at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. Before use, cells were plated at 2×10⁵ cells per well and transiently transfected with complexes containing expression plasmids and lipofectamine 2000

(1 µg in 4 µL), according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). After transfection, cells were cultured in DMEM supplemented with 1% FCS.

RNA isolation and real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from 2×10^5 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 HS3ST3A, HS3ST3B and HS3ST4 were described in [24]. Synthetic primers for HS3ST2 were designed by using Primer-Blast (NCBI): 5'-GCTCTCGAGGGTCTGGGCA-3' (forward), 5'-TGTGGGCGTGAAGAAGGGGG-3' (reverse). 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), as described in [26]. 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. 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 analysis.

SDS-PAGE and Western blot

MDA-MB-231 cells (4×10^5 per point) were lysed in 150 µL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, pH 8.0) supplemented with a mixture of protease and phosphatase inhibitors (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). Samples corresponding to twenty micrograms of proteins were mixed with Laemmli buffer and boiled for 10 min. Proteins were then separated by SDS-PAGE 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) with 0.05% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) BSA (Roche), and then probed with primary antibodies (1/2000) overnight in TBS supplemented with 5% (w/v) BSA. After washing, HRP-conjugated secondary antibodies (1/10,000) were added for 1 h at room temperature and immunoreactive proteins were detected using ECL prime Western blotting detection (GE Healthcare). Quantification of immunostaining intensity was performed by using Image J software.

Compositional analysis of HS disaccharides

Composition of HS was analysed by reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC), using a fluorescent method of pre-column labelling of disaccharides with 2-aminoacridone (AMAC), as described in [24,27]. Briefly, 30×10^6 cells were collected and treated with Pronase E (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) (1.5 mg/ml) and benzonase (250 mU/ml). After clarification, samples were loaded on DEAE-Sepharose column (Merck Millipore). The column was extensively washed with phosphate buffer containing 0.3 M NaCl, after which remaining bound molecules were eluted with the same buffer containing 2 M NaCl. Chloroform was then added to the sample (vol/vol) and the mixture was stirred vigorously. Aqueous phase was recovered and dialysed against water for 16 h at 4°C (Slide-A-Lyser 2000 Da, Thermo Fischer Scientific). After freeze drying, material (5 µg of total glycosaminoglycans, as quantified by carbazole assay) was treated with a mixture of heparinases I, II and III (Iduron, Manchester, UK) (10 mU each/sample) for 16 h at 37°C. Sample was then filtered on an Amicon 3000-Da unit (Merck Millipore) and the fraction containing disaccharides was collected and freeze-dried. For AMAC labelling, HS digests were dissolved in 10 µL of glacial acetic acid/DMSO (15:85, v/v) solution containing 0.1 M AMAC plus 10 µL of sodium cyanoborohydride solution (1 M in water). The reaction was carried out for 5 h at 45°C, after which time 15 µL of 50% (v/v) DMSO was added to the samples. AMAC-labelled disaccharides were then diluted with water to a final volume of 200 µL and applied to a Kinetex core-shell C18-column (Phenomenex, Le Pecq, France) 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. 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 analysed with the Star software (v6.43).

Cell proliferation

MDA-MB-231 or BT-20 cells were plated at 5×10^4 cells/mL in 4 mL of DMEM, transfected with expression plasmids and then cultured for 24 h or 48 h. Then, they were collected and directly counted with Trypan Blue to exclude dead cells. In parallel experiments, cell proliferation was estimated by using the Cell-Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, Fitchburg, USA). To this end, 2×10^3 transfected cells were plated in 200 µL. At the indicated times, 20 µL of MTS/PMS (95:5, v/v) solution was added to each well of culture and reaction was developed at 37°C for 1 h. Absorbance was measured at 490 nm using a BioTek Epoch microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, USA). This assay involves conversion of a MTS tetrazolium compound to a colored formazan product

whose absorbance is directly proportional to the number of metabolically active cells, thus providing information on the number of viable cells in cell proliferation experiments.

Colony formation assay

To investigate the effects of each HS3ST on colony formation, 2×10^3 transfected MDA-MB-231 cells were seeded in six-well plates and cultured in DMEM complemented with 1% FCS for 9 days and then in DMEM with 10% FCS for 3 days. At the end of culture, cells were washed with phosphate buffer saline (PBS), fixed in the presence of 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) for 30 min at room temperature, and stained with 0.05% crystal violet for 15 min. After extensive wash with water, the number of colonies was counted.

Induction and measurement of apoptosis

Cell apoptosis was evaluated by measuring phosphatidylserine externalization and caspase-3 activation, essentially as described in [26]. Briefly, apoptosis was induced in transfected MDA-MB-231 cells (2×10^5 cells per point) by the addition of 100 ng/mL of anti-Fas antibody (Merck Millipore) plus 100 ng/mL TNF- α (PeproTech) for 24 h at 37°C, or by the addition of 1 μ M staurosporin (Merck Millipore) for 4 h at 37°C. Thereafter, cells were stained with annexin-V and propidium iodide (PI) by using the Annexin-V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) and analysed by flow cytometry using a FACSCalibur instrument and the CellQuest software (BD Biosciences). This procedure allows assignment of cells in viable (annexin-V $-$ /PI $-$), early apoptotic (annexin-V $+$ /PI $-$), late apoptotic (annexin-V $+$ /PI $+$) and necrotic (annexin-V $-$ /PI $+$) populations. Apoptosis was also evaluated by measuring the activation of caspase-3, by using the Caspase-3 assay fluorimetric kit (Sigma-Aldrich). For each experimental condition, 5×10^4 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 (CentroLuminometer, Berthold, Bad Wildbad, Germany). 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.

Isolation and culture of NK cells

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), NK cells were purified with magnetic beads coupled to CD56, according to the instructions of the manufacturer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Purity of the cell population was assessed by flow cytometry

and found > 95%. NK cells were then cultured for 24 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS, in the presence of 50 µg/mL of poly-IC (polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt) (Sigma). The experiments were undertaken with the understanding and written consent of each donor (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).

Measurement of NK cell cytotoxicity

NK cell-induced cytotoxicity of MDA-MB-231 cells was analysed by measuring the activity of released lactate dehydrogenase (LDH) in cell supernatants, using the CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, Fitchburg, USA). Briefly, 10×10^3 transfected MDA-MB-231 cells were plated in 100 µL of PBS complemented with 2.5% FCS. NK cells were then added into the wells at the target cells/effector cells ratios 1:1, 1:5, 1:10 and incubated for 5 h at 37°C in the presence of 20 ng/mL of interferon-γ (IFN-γ). Thereafter, 50 µL of the supernatants are mixed with 50 µL of LDH substrate and incubated for 30 min in the dark. Absorbance was measured at 490 nm as above. Maximum LDH release was induced by the addition of 0.8% Triton X100. The percentages of cytotoxicity were determined as follows: $[(\text{experimental lysis} - \text{effector spontaneous lysis} - \text{target spontaneous lysis}) / (\text{target maximum lysis} - \text{target spontaneous lysis})] \times 100$.

Statistical analysis

Results are representative of at least three independent experiments conducted with separate preparations of transfected cancer cells and NK cells from different donors. All values are expressed as the means ± SD. Statistical significance between the different values was analysed by using one-way ANOVA and two-tailed Student's t-tests, with a threshold of $P < 0.05$ considered as significant.

Results

Overexpression of HS3ST2, 3A, 3B and 4 in breast cancer cells

The expression of type gD HS3STs is either very low or negligible in epithelial tumor cells, when compared to the other sulfotransferases involved in HS maturation [14,22,23]. In order to examine the functional impact of high levels of expression of these enzymes in cancer cell behavior, we decided to use transient overexpression systems. MDA-MB-231 was chosen as a representative breast cancer cell line of the basal-like subtype [28]. As expected, transfection with the plasmids encoding HS3ST2, 3A, 3B and 4 resulted in a strong expression of each isozyme in MDA-MB-231 cells, as demonstrated by RT-PCR (Fig 1A) and Western blot (Fig 1B). Flow cytometry analysis with anti-HS epitope antibody indicated that overexpression

of each gD-type HS3ST was accompanied by an increase in 3-*O*-sulfation of cell surface HS. When compared with parental cells, we found indeed that the expression of each HS3ST enhanced the binding of HS4C3 antibody (Fig 1C), which preferentially reacts with highly sulfated HS epitopes containing 3-*O*-sulfate groups [23].

In order to provide structural information on the changes induced by HS3ST overexpression in MDA-MB-231 cells, HS were purified and digested with a mixture of heparinases. The resulting disaccharides were labelled with AMAC and analysed by RP-HPLC with fluorescent detection (S1 Fig). As already described [24,27], the fluorescence profiles contained identifiable peaks, which are representative of the typical HS components. Analysis of HS digests from MDA-MB-231 cells transfected with empty vector revealed an overall level of sulfation of ~ 1.2 sulfate/disaccharide, coupled to relative high amounts of Δ UA-GlcNAc ($33 \pm 4\%$) and Δ UA2S-GlcNS disaccharides ($34 \pm 4\%$). In contrast, it did not contain a great abundance of the trisulfated Δ UA2S-GlcNS6S disaccharide ($7 \pm 2\%$) (Fig 1D). Analysis of HS digests from HS3ST-overexpressing cells also indicated a composition dominated by Δ UA-GlcNAc and Δ UA2S-GlcNS disaccharides. The overall sulfation level was estimated to ~ 1.17 sulfate/disaccharide on average, without any notable difference between each HS3ST-overexpressing cell type. However, a striking observation was the complete disappearance of the trisulfated Δ UA2S-GlcNS6S disaccharide in the elution profiles of HS digests. Conversely, analysis of HS components revealed the appearance of new peaks, which may be 3-*O*-sulfated products (S1 Fig). Due to the unavailability of commercial standards, 3-*O*-sulfated disaccharides cannot be directly identified. In their work, Mochizuki et al. [29] reported that gD-type HS3STs mainly use IdoUA2S-GlcNS6S-containing sequences as acceptor substrates and produce tetrasulfated units as a major product from both heparin and HS. Consequently, the disappearance of the trisulfated disaccharides could reflect the reaction of 3-*O*-sulfation in HS3ST-overexpressing cells. Most notably, the peak named (a) in the elution profile of HS digests from HS3ST-overexpressing cells could be the tetrasulfated disaccharide containing a 3-*O*-sulfo group. On another hand, previous works reported the presence of unusual 3-*O*-sulfated GlcNH₃⁺ residue in heparin [30,31]. Nevertheless, such 3-*O*-sulfated N-unsubstituted GlcN units have never been characterized in natural HS, which suggest that they could derive from N-desulfation during the process of purification and/or depolymerisation [5,29]. Thus, the small peak (b) that elutes just after the Δ UA2S-GlcNS standard may contain such products containing 3-*O*-sulfated GlcNH₃⁺ units (Fig 1D).

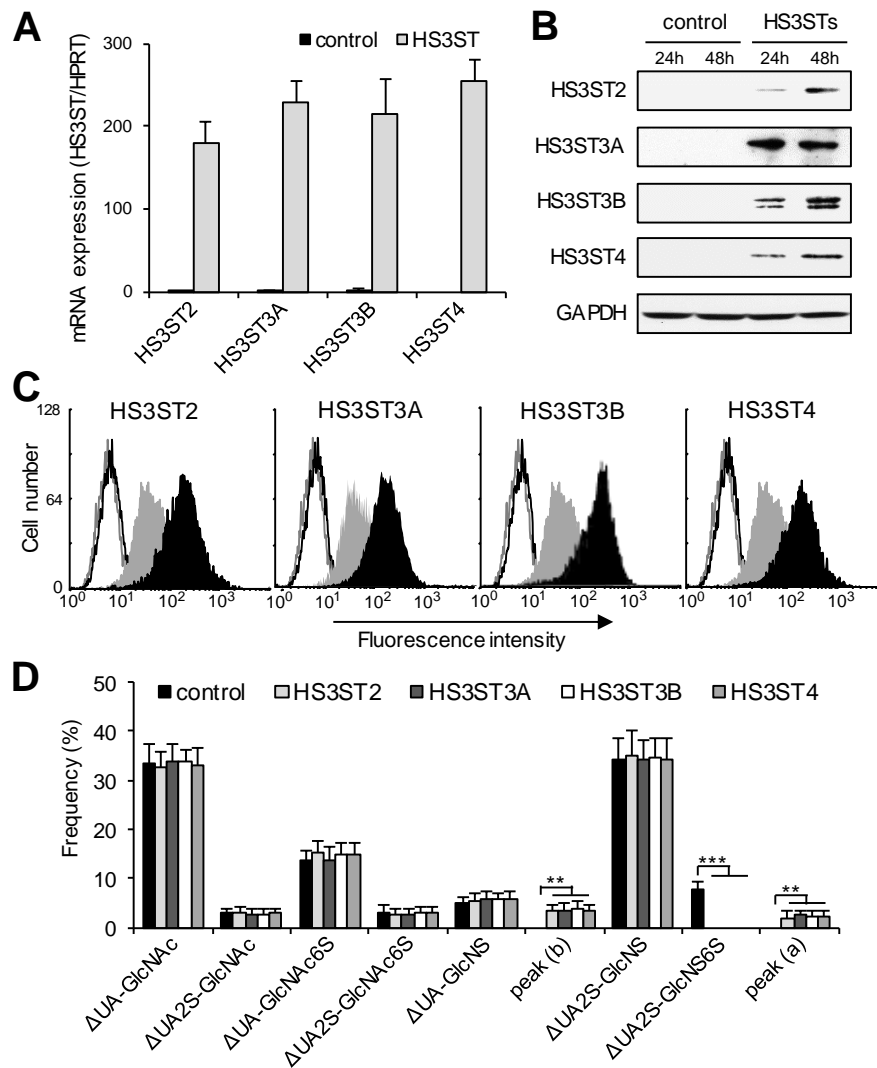


Fig 1. Overexpression of gD-type HS3STs in MDA-MB-231 cells. Cells were transiently transfected with empty vector (control) or vectors encoding HS3ST2, HS3ST3A, HS3ST3B or HS3ST4, and then cultured for 24 h and 48 h prior analysis of the expression and activity of each isozyme. **(A)** Following RNA extraction, the mRNA levels of HS3STs were quantified by real-time RT-PCR at 24 h post-transfection. Relative abundance of the transcripts was normalized to endogenous HPRT mRNA. Data are means \pm SD from at least three distinct experiments. **(B)** In parallel experiments, proteins from cell lysates were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting with appropriate specific antibodies. Parallel immunoblotting with antibodies to GAPDH confirmed equal loading of the samples. **(C)** Efficiency in the reaction of heparan 3-O-sulfation was confirmed 48 h post-transfection by using HS4C3 antibody. Cell surface fluorescent staining was detected by flow cytometry. Filled histograms represent the staining obtained with HS4C3 antibody, while open histograms correspond to the binding of the irrelevant antibody MBP49. Each panel represents the binding of the antibodies to the surface of HS3ST-expressing cells (black histograms) compared to the binding of the same antibodies to control cells (grey histograms). Data are representative of three separate experiments. **(D)** Compositional disaccharide analysis of HS from transfected MDA-MB-231 cells. Following depolymerization of HS with a mixture of heparinases, disaccharides were labelled with AMAC and resolved by RP-HPLC (see S1 Fig). Data are expressed as frequency of each disaccharide and correspond to means \pm S.D. from two sets of triplicate injections performed with distinct cell preparations (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different when compared to control cells).

Effects of HS3ST overexpression on cellular proliferation and viability

In previous works, HS3ST2 was reported to increase the viability and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells [14]. More recently, overexpression of HS3ST3A was described to have an opposite effect on the proliferation of MDA-MB-231 cells [22]. Thus, we decided to reevaluate the effects of these gD-type HS3STs in the same cellular model. To this end, MDA-MB-231 and the less invasive BT-20 cells were transiently transfected with plasmids encoding HS3ST2, 3A, 3B or 4, and thereafter cultured for 24 and 48 h in the presence of 1% of FCS. In our hands, overexpression of HS3ST2 resulted in a significant increase in the growth of both cancer cell lines. At 48 h post-transfection, the rates of proliferation (Fig 2A) and viability (Fig 2B) of HS3ST2-transfected MDA-MB-231 cells were about 1.6- and 1.4-fold increased as compared with parental cells transfected with vector control, respectively. A similar increase in the rates of proliferation and viability of BT-20 cells was also observed ($\times 1.6$ and $\times 1.3$ as compared to vector control, respectively). Interestingly, we found that the expression of HS3ST3B and HS3ST4 similarly enhanced the proliferation and viability of both cell lines, without any notable difference between the three isozymes. In contrast, overexpression of HS3ST3A had no significant impact on the proliferation of MDA-MB-231 and BT-20 cells, meaning that HS3ST3A did not share the same properties than other gD-type HS3STs. Together, these first results suggest that the impact of HS3STs on cancer cell behavior could be dependent on the type of isozyme.

When the experiments were reproduced in the presence of 10% FCS, we did not observe any notable difference in cell growth between control and HS3ST-expressing cells. These findings suggest that overexpression of HS3ST2, 3B or 4 probably enhanced cell proliferation and viability *via* the activation of autocrine signaling pathways, which would be masked by the presence of 10 % FCS. To test this hypothesis, clonal survival assays were carried out with MDA-MB-231 cells. Such an experiment could give us important information about the ability of individual cells to grow into colonies. Transfected cells were thus seeded at low cellular density (2×10^3 cells per well) and cultured in the presence of 1% FCS. Thereafter, colonies were stained with crystal violet and counted (Fig 3A). Our results showed that the colony forming capacity of MDA-MB-231 overexpressing HS3ST2, 3B and 4 has more than doubled when compared to control cells, and no notable difference was observed between the three isozymes (Fig 3B). In contrast, overexpression of HS3ST3A had no enhancing effect on the colony forming capacity of MDA-MB-231 cells, as compared with parental cells transfected with control vector (S2 Fig). Together, these results reinforce the idea that HS3ST2, 3B and 4 have the same functional impact on the proliferation and viability of MDA-MB-231 cells.

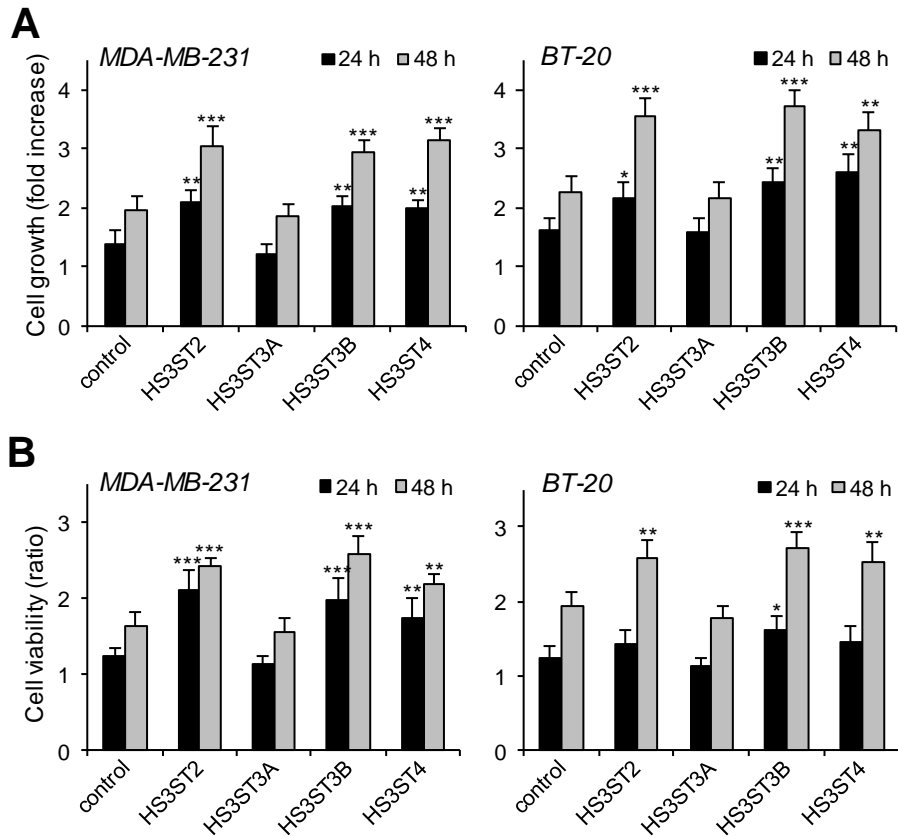


Fig 2. Effects of the expression of HS3ST2, HS3ST3A, HS3ST3B and HS3ST4 on breast cancer cell growth. MDA-MB-231 and BT-20 cells were transfected with overexpression vectors and cultured in medium containing 1% FCS for 24 h and 48 h. At each time, the effects of HS3STs on the growth of MDA-MB-231 and BT-20 cells was estimated by cell counting (A) and MTS assay (B). Results are expressed as fold changes by comparison with control cells transfected with empty vector. Data are means \pm S.D. from three separate experiments performed independently (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different when compared to control cells).

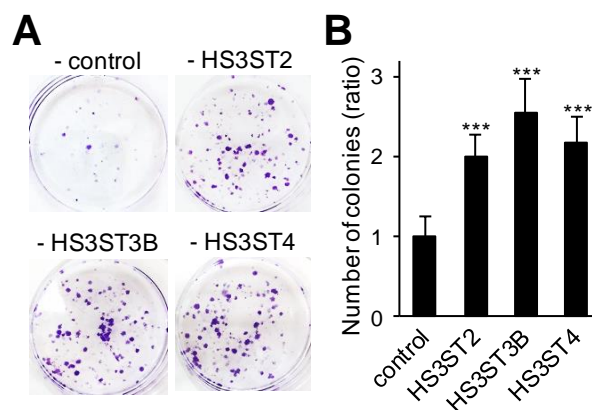


Fig 3. Effects of the expression of HS3ST2, HS3ST3B and HS3ST4 on colony formation in MDA-MB-231 cells. (A) Equal numbers of control and HS3ST-overexpressing cells (2000 per well) were seeded in six well plates and maintained for nine days in DMEM complemented with 1% FCS to form colonies. Fresh complete growth medium was then added for three days, after which the colonies were stained with crystal violet. The right panel (B) represents the quantification of the colonies per well. Results are expressed as fold changes by comparison with control cells transfected with empty vector. Data are means \pm S.D. from five separate experiments performed independently (*** $P < 0.001$, significantly different when compared to control cells).

Modulation of signaling pathways by the expression of HS3STs

To explore the molecular mechanisms responsible for the functional impact of HS3ST2, 3B and 4, we analysed the principal signaling pathways that regulates breast cancer cell growth, invasiveness and survival [32-37]. Following transfection, MDA-MB-231 cells were cultured for 20 h in the presence of 1% FCS and then serum-starved for 3 h before analysis of the activation status of Akt, ERK1/2, c-Src, NF- κ B and STAT3. As shown in Fig 4, HS3ST-transfected groups with HS3ST2, 3B and 4 all displayed higher levels of phosphorylated forms of Akt, c-Src and NF- κ B p65 as compared to vector control. Concomitantly, we observed a dramatic decrease in the amount of I- κ B, which confirmed the activation of the NF- κ B pathway. In contrast, the levels of phosphorylated ERK1/2 and STAT3 were not significantly affected by the overexpression of HS3ST2, 3B and 4. Consistent with our first results, we found that overexpression of HS3ST3A did not have any enhancing effects on the activation of signaling pathways (S2 Fig). Sustained activation of Akt and NF- κ B signaling pathways has been associated with increase in tumorigenesis and enhancement of pro-survival signals. Hence, we examined the effects of HS3STs on the expression of the anti-apoptotic molecules Bcl-2, Bcl-xL, XIAP and survivin [36-38]. Transfection with each HS3ST had no apparent effect on Bcl-2 and Bcl-xL expression, as compared to vector control (data not shown). In contrast, we found a significant increase in the levels of XIAP and survivin in transfected groups with HS3ST2, 3B and 4 (Fig 4), but not with HS3ST3A (S2 Fig). These results indicate that overexpression of HS3ST2, 3B and 4 probably enhanced cell viability by modulating certain pro-survival signals.

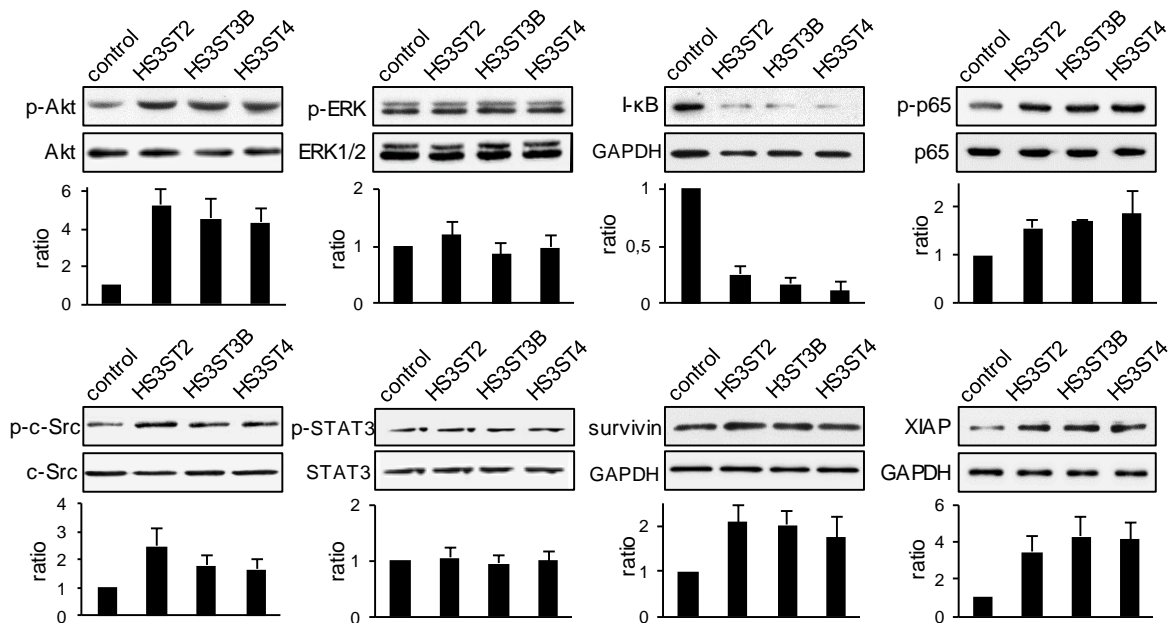


Fig 4. Effect of the expression of HS3ST2, HS3ST3B and HS3ST4 on cell signaling. Twenty hours post transfection, MDA-MB-231 cells were serum-starved for 3 hours, collected and lysed. Proteins were then separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting with antibodies to I-κB, survivin, XIAP and to the phosphorylated forms of c-Src, Akt, ERK1/2, STAT3 and NF-κB p65 subunit. Parallel immunoblotting with antibodies to GAPDH and to c-Src, Akt, ERK1/2, STAT3 and NF-κB p65 regardless of their phosphorylation status confirmed equal loading of samples. Histograms represent the quantification of the phosphorylation status of c-Src, Akt, ERK1/2, STAT3, NF-κB p65 and of the expression of I-κB, survivin and XIAP related to GAPDH. Data were normalized to control cells. Representative results from three independent experiments are shown.

HS3ST-mediated protection of MDA-MB-231 cells against apoptosis

To determine whether the increased levels of pro-survival signals in MDA-MB-231 cells may have a protective effect against apoptotic cell death, HS3ST-transfected cells were cultured for 48 h and then exposed to staurosporin for 4 h. We used this pharmaceutical agent because it strongly induces cell death *via* the intrinsic apoptotic pathways. In parallel experiments, HS3ST-expressing cells were also exposed to a mixture of anti-Fas antibody plus TNF-α for 24 h, in order to mimic the delivery of extracellular death signals mediated by TNF receptor and Fas antigen [39]. Analysis of cell death using annexin-V staining showed that overexpression of HS3ST2, 3B and 4 was anti-apoptotic in MDA-MB-231 cells, whereas this effect was not observed in HS3ST3A-overexpressing cells (Fig 5A). In the absence of any treatment, the percentage of apoptotic cells (including early and late apoptotic cells) was less than 10% in all groups. Exposure of control cells to staurosporin or anti-Fas/TNF-α mixture resulted in a significant induction of cell death, with an apoptotic cells rate corresponding to $32 \pm 3\%$ and $29 \pm 5\%$ of the whole cell populations, respectively. In contrast, the expression of HS3ST2, 3B or 4 significantly reduced cell death induced by both the pro-apoptotic treatments. The percentages of apoptotic cells were indeed estimated at $19 \pm 2\%$ and $18 \pm 5\%$ of the whole cell populations after exposure of HS3ST2-transfected cells to staurosporin and anti-Fas/TNF-α mixture, respectively. No notable difference was observed between the

three isozymes, meaning that HS3ST3B and 4 were as effective as HS3ST2 for protecting MDA-MB-231 cells against apoptosis. In order to validate these results, we next examined the protective properties of each HS3ST on the activation of caspase-3, because of the key role of this protease in the induction of apoptosis. As shown in Fig 5B, treatment with staurosporin or anti-Fas/TNF- α mixture induced the activation of caspase-3 in control cells ($\times 3.2$ and $\times 2.3$ compared with untreated cells). As expected, overexpression of HS3ST2, 3B and 4 was effective to reduce the activation of caspase-3, when compared to the responses measured in control and HS3ST3A-transfected cells. Collectively, these data indicate that high level of expression of HS3ST2, 3B or 4 was protective against apoptosis induced in MDA-MB-231 cells.

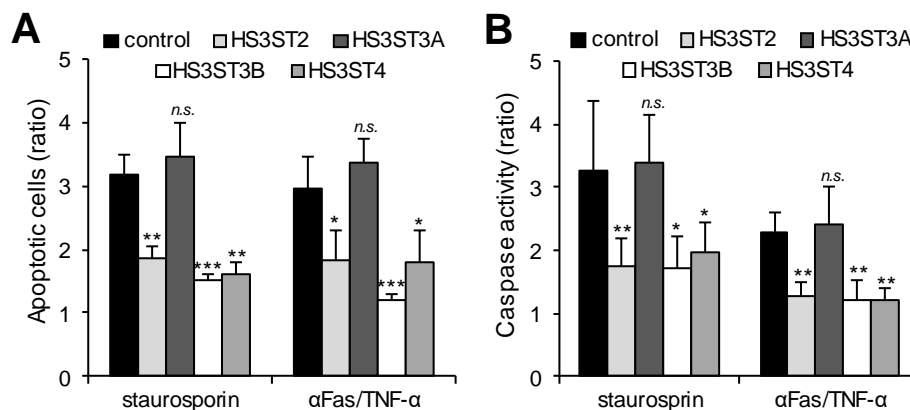


Fig 5. Protective effects of the expression of HS3ST2, HS3ST3B and HS3ST4 against apoptosis. Transfected MDA-MB-231 cells were treated with staurosporin (1 μ M) for 5 h or with a mixture of anti-Fas antibody (100 ng/mL) and TNF- α (100 ng/mL) for 16 h. **(A)** The percentage of apoptotic cell population was evaluated by analyzing the binding of fluorescein-conjugated annexin-V. Each bar of histogram represents mean \pm S.D. of the rate of apoptotic cells by comparison with untreated control cells. Data were obtained from three distinct experiments. **(B)** In parallel experiments, the activation of caspase-3 was analysed in HS3ST-overexpressing cells and in control cells after exposure to either staurosporin or to the mixture of anti-Fas antibody plus TNF- α . Results are expressed as fold increase in caspase-3 activity by comparison with untreated control cells and correspond to means \pm S.D. from three independent experiments (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, significantly different when compared to control cells; n.s., not significantly different).

HS3ST-mediated protection of MDA-MB-231 cells against NK cells

The lines of evidence indicating that HS3ST2, 3B and 4 enhanced survival of MDA-MB-231 cells prompted us to investigate the impact of their expression on NK-mediated cell death. After a 5-hour incubation, the cytotoxicity induced by NK cells against HS3ST-transfected cells was detected by LDH assay (Fig 6). As expected, the lysis percentage of MDA-MB-231 cells increased along with the increase of the target/effector ratios. In control, NK cells indeed damaged 26%, 37%, and 46% of MDA-MB-231 cells at the target/effector ratios 1:1, 1:5, 1:10, respectively. Considering the same target/effector ratio, the lysis percentage of the transfected groups with HS3ST2, 3B and 4 were significantly reduced. As examples, NK cells respectively destroyed 15%, 24% and 26% of HS3ST2-transfected MDA-MB-231 cells. Apart from the differences noted with control and HS3ST3A-transfected cells, the lysis percentages

of the transfected groups with HS3ST2, 3B and 4 were not significantly different from each other, which further indicate that the three isozymes share similar protective properties in MDA-MB-231 cells.

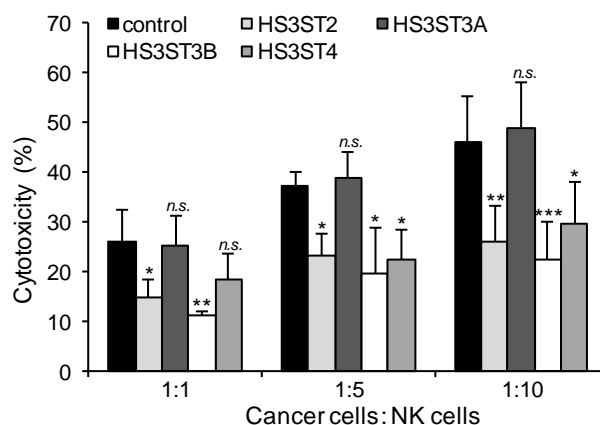


Fig 6. Effects of the expression of HS3STs on NK-mediated cell death. Control or HS3ST-overexpressing MDA-MB-231 cells were cultured for 32 h and then exposed to activated NK cells for 5 h at the different ratios target/effecter 1:1, 1:5 and 1:10. NK-mediated cytotoxicity was estimated by using a LDH assay, as described in “Materials and Methods”. Data are means \pm S.D. from three separate experiments performed with NK cells from distinct donors (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different when compared to control cells; n.s., not significantly different).

Discussion

The functions of 3-*O*-sulfation have been well-described in the anticoagulant activity of HS/heparin and in the facilitation of HSV-1 infection. Based on their capacity to generate binding sites for either AT-III or HSV-1 gD, HS3STs have been divided into two subgroups. HS3ST1 and HS3ST5, referred to as AT-type, are involved in the synthesis of the anticoagulant-active HS sequences, while gD-type isozymes, including HS3ST2, 3A, 3B, 4 and 6, are required to provide the HS-binding sites for the protein gD of HSV-1 [6-12]. Besides, the roles of HS3STs in the regulation of other physiological and pathological processes remains largely unclear [5]. HS3ST2, 3A, 3B and 4 have been recently described to exhibit tumor-promoting effects in various cellular models [14-17,22]. A conflicting literature has however suggested that high expression of HS3ST2 and 3A may result in the suppression of tumor cell growth [18,19,20-22]. Although contradictory, these studies suggest that abnormal expression of gD-type HS3STs may have a functional impact on cancer cell behavior. However, the function of one isozyme compared with the others and the molecular mechanisms underlying these effects remain largely unknown. Hence, we decided to compare the responses induced by transient overexpression of HS3ST2, 3A, 3B and 4 in the same cellular models.

To ascertain that overexpression of HS3STs was accompanied by changes in HS structure, we analysed the disaccharide compositions of HS from transfected MDA-MB-231 cells. As expected, we identified typical disaccharides, which are representative of the components usually found in HS. Compositional analysis of HS digests revealed however some

striking differences. The most remarkable modification was the complete disappearance of the UA2S-GlcNS6S disaccharide in HS contents from HS3ST-transfected cells. These findings suggest that these trisulfated units may have served as substrate acceptors for the reaction of 3-*O*-sulfation. Two new peaks were indeed visualized in the elution profile of HS digests from HS3ST-overexpressing cells, which may correspond to 3-*O*-sulfated products [14,29]. On this assumption, 3-*O*-sulfated disaccharides would represent only a minor fraction within HS disaccharides from HS3ST-transfected MDA-MB-231 cells. These findings were however expected, because gD-type HS3STs were described to preferentially modify HS structures in S-domains, which contain trisulfated disaccharide units [5,29]. Thus, this restricted substrate specificity may explain the low frequency of 3-*O*-sulfated disaccharides in HS from gD-type HS3ST-expressing cells.

One of the principal hallmarks of cancer cells is their uncontrolled growth, which results of two complementary mechanisms: increased proliferation and establishment of survival signals giving them enhanced viability [35]. We found here that overexpression of HS3ST2, 3B or 4 resulted in a significant increase in the proliferation and viability of MDA-MB-231 and BT-20 cells, without any significant difference between the three isozymes. In their works, Vijaya-Kumar et al. [14] had already reported that HS3ST2 was capable of increasing the viability of MDA-MB-231 cells. In line with these findings, our results indicate that HS3ST3B and 4 share with HS3ST2 the same enhancing effects, which suggests that 3-*O*-sulfated HS may exhibit pro-tumoral properties irrespective of the HS3ST isozyme. We found, nevertheless, that overexpression of HS3ST3A did not have any enhancing effect on the proliferation and survival of MDA-MB-231 cells. Although intriguing, these results are in line with the findings that HS3ST3A rather exhibits anti-proliferative properties in MDA-MB-231 cells [22]. As a prerequisite of our study, we had checked that overexpression of each of the four HS3STs resulted in similar modifications in HS structure, which excludes that the difference observed with HS3ST3A could be due to a default in the reaction of 3-*O*-sulfation. Thus, our results suggest that the impact of gD-type HS3STs on breast cancer cell behavior could be dependent on the type of isozyme. Structural analysis showed that these isozymes recognize at least an HS pentasaccharide, in which a 2-*O*-sulfated IdoUA resides at the non-reducing side [4,11,40,41]. There is however little information about the oligosaccharide sequence towards the reducing side of the 3-*O*-sulfation sites [42]. On another hand, the diversification of HS3STs and the fact that many cell lines express multiple isozymes simultaneously suggest that there may be subtle differences in substrate specificities, even in the same subgroup. Evidence that HS3STs may generate distinct motifs has emerged from the Zebrafish model, in which two isozymes independently influence cilia function in the Kupffer's vesicle [43]. Knockdown of HS3ST5 resulted in decreased cilia length, while the loss of HS3ST6 had no

impact on cilia length but impaired cilia movement. Importantly, two other HS3STs are coexpressed in the cells making up Kupffer's vesicle, but they were unable to compensate for the loss of either HS3ST5 or 6. Together, these findings demonstrate distinct roles for multiple HS3STs, supporting the idea that individual isozyme may create unique 3-*O*-sulfated sequences. In line with this assumption, HS3ST3A may have a restricted substrate specificity, making it incapable of synthesizing 3-*O*-sulfated sequences with pro-tumoral activity. Conversely, HS3ST2, 3B and 4 may exhibit a broader selectivity or share, at least in part, some common acceptors. Further investigations will be needed to better define the substrate specificities of gD-type HS3STs and to elucidate the selectivity of each isozyme.

The ability of individual cancer cells to grow into colonies is characteristic of the activation of survival signals leading to enhanced cellular viability. We found here that the colony forming capacity of MDA-MB-231 cells markedly increased after transfection with the constructs encoding HS3ST2, 3B and 4. No significant difference was observed between the three groups, which further supports the idea that high expression of each of the isozymes has the same functional impact on MDA-MB-231 cell behavior. Accordingly, we analysed the principal signaling pathways that regulates breast cancer cell proliferation and survival. In our hands, ERK1/2 and STAT3 appeared not significantly affected by the overexpression of HS3ST2, 3B and 4. A strong constitutive activation of these signaling pathways have been already described in MDA-MB-231 cells, which may explain why we did not observe any change in the levels of the phosphorylated forms of ERK1/2 and STAT3 [32,44]. In contrast, we found that overexpression of HS3ST2, 3B or 4 resulted in sustained activation of Akt, c-Src and NF- κ B, in comparison with parental and HS3ST3A-transfected cells, meaning that the expression of each of the three isozymes has maintained a high activation of the corresponding signaling pathways in serum-starved cells. Aberrant activation of Akt, c-Src and NF- κ B have been reported to favor tumorigenesis and to enhance the resistance to apoptosis in many cancer cell types *via* the activation of pro-survival signals [33-36]. In line with these observations, high levels of survivin and XIAP, two members of the Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAP) family, were detected in MDA-MB-231 cells that expressed HS3ST2, 3B and 4. Both these anti-apoptotic proteins are highly expressed in most cancers and contribute to the protection of cancer cells by acting downstream of death receptor-induced or mitochondrial apoptosis [37,38]. These findings led us to analyse the protective effects of each of the three HS3STs against cell death induction by staurosporin or anti-Fas/TNF- α mixture. As expected, our results demonstrated that high expression of HS3ST2, 3B and 4 significantly desensitized MDA-MB-231 cells to both apoptosis-inducing treatments. Indeed, the levels of activated caspase-3 and of externalized phosphatidylserine, an indicator of mitochondrial dysfunction, were significantly reduced in transfected cells. The NF- κ B pathway has been implicated in the

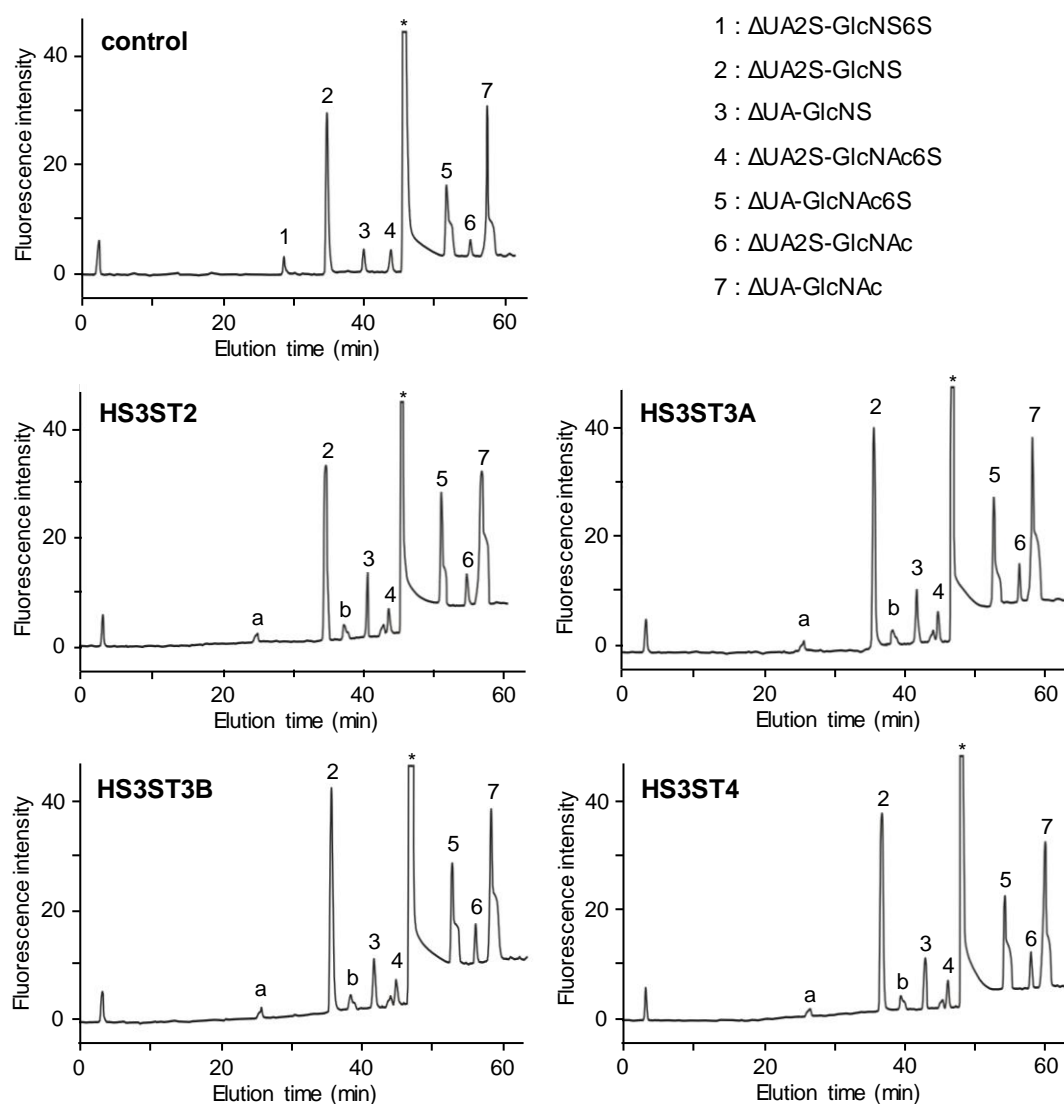
synthesis of inhibitors of caspases, including survivin and XIAP. Both these anti-apoptotic proteins were described in turn to modulate NF- κ B activation, reinforcing the idea that survivin and XIAP confer a broad advantage for cancer cells [36-38]. Accordingly, the current findings suggest that activation of the NF- κ B/survivin/XIAP axis may be one of the principal mechanisms by which HS3ST2, 3A or 4 enhance cell survival. Additionally, we showed that the cytolytic activity of NK cells against cells transfected with HS3ST2, 3B or 4 was significantly reduced as compared to the lysis observed in parental or HS3ST3A-expressing cells. Exposure of cells to anti-Fas antibody plus TNF- α mimic the delivery of extracellular death signals mediated by TNF receptor and Fas antigen [39]. Thus, the protective effects of the three HS3STs against the anti-tumoral activity of NK cells could be linked to a similar inhibition of death receptor-mediated induction of apoptotic signals into target cells. On another hand, 3-*O*-sulfated HS may be also involved in the modulation of the activity of NK-cell receptors. Membrane-associated HS of target cells were indeed reported to interact with certain NK receptors [45]. Most recently, interaction between the NK receptor KIR2DL4 and 3-*O*-sulfated HS was demonstrated to regulate the activity of the receptor and its capacity to interact with other ligands [46]. Whether 3-*O*-sulfated HS of cancer cells are functional ligands for NK cell receptors remains however to be further explored.

Many HS-binding ligands use cell surface proteoglycans as co-receptors to interact with their signaling receptors, which leads to enhanced signal transduction. We showed here that transient transfection with constructs encoding each HS3ST isozyme resulted in an increase in 3-*O*-sulfated HS epitopes. Consequently, HS3ST-mediated HS alteration may have influenced ligand binding to the cell surface, leading to an alteration of diverse signaling processes. Whether 3-*O*-sulfated HS modulates ligand-receptor interactions on cancer cells is however largely unknown. On another hand, the effects of HS3ST2, 3B and 4 on cell proliferation and survival could be only observed at low concentration of FCS. These findings indicate that the functional impact of HS3ST overexpression was probably related to an autocrine mechanism of cell activation, which deserves additional consideration to identify the relevant ligands and receptors that interact with 3-*O*-sulfated motifs. To date, only a few proteins have been reported to interact with HS3ST-modified HS, probably because of the lack of available material for study [5]. Among them, cyclophilin B (CypB) was described to interact with 3-*O*-sulfated HS at the surface of T lymphocytes and monocytes/macrophages [23,31]. We recently demonstrated that it is capable of protecting macrophages against apoptosis, *via* a mechanism dependent on the expression of HS3ST2 [26]. HS3ST2-modified HS were also reported to enhance the binding of neuropilin-1 and to regulate its activity in neurons and endothelial cells [13]. Importantly, the expression of neuropilin-1 or its homologue neuropilin-2 by cancer cells was related to tumor initiation, growth, metastasis and immunity. They could be contributing

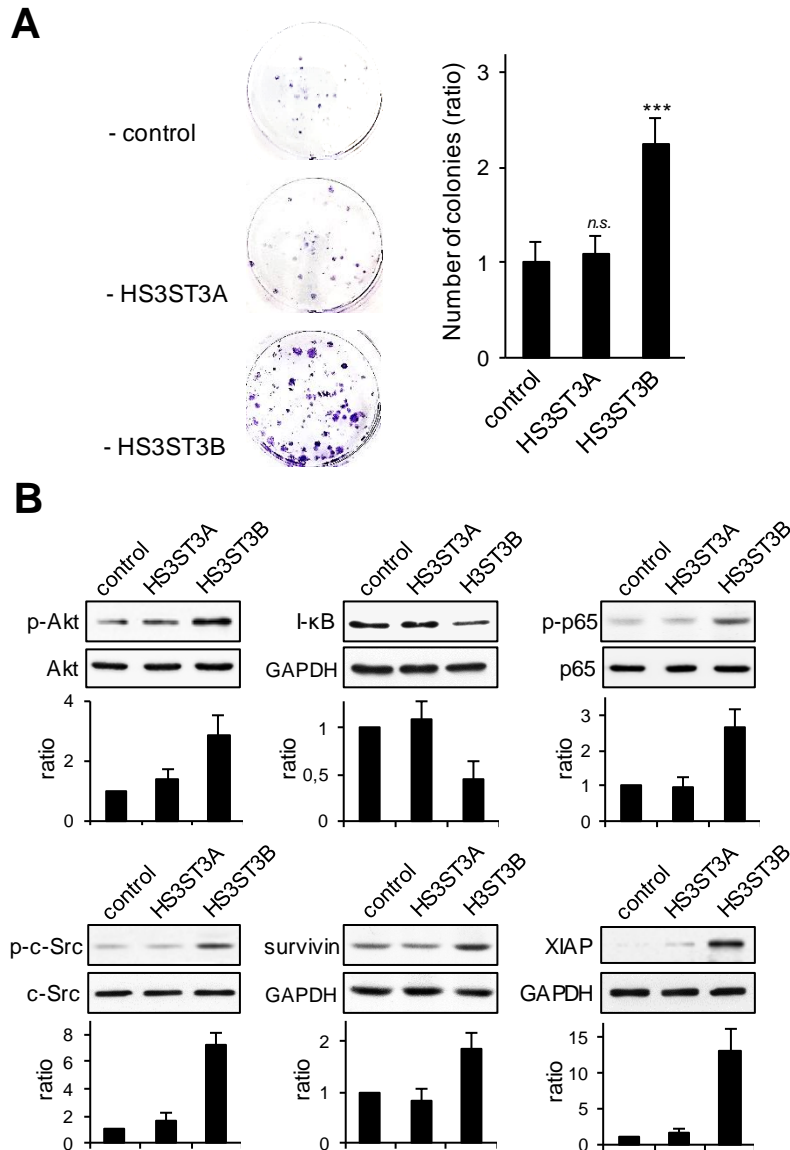
to cell proliferation, migration, invasion and survival, by interacting with a large panel of growth factors and their cognate signaling receptors [47]. These findings support the attractive idea that HS3ST expression in cancer cells might favor the interaction of either CyPB or neuropilins with signaling receptors at the cell membrane. These assumptions are currently under investigation in our laboratory.

In conclusion, we demonstrated that overexpression of HS3ST2, 3B and 4 enhanced proliferation and survival of the breast cancer MDA-MB-231 cells. This is accompanied by increased activation of the signaling molecules c-Src, Akt and NF- κ B and up-regulation of the cytoprotective proteins survivin and XIAP. Consistently, we found that HS3ST-expressing cells are more resistant to cell death induction by either pro-apoptotic stimuli or NK cells. These findings support the idea that HS3ST2, 3B and 4 share the same pro-tumoral activity in breast cancer cells. In normal physiological conditions, HS3ST3B transcripts are widely expressed in many organs. HS3ST2 was detected in neurons and macrophages, whereas the expression of HS3ST4 is restricted to the brain [4,7,24,41]. Hypermethylation of the genes encoding HS3ST2 has been described in certain cancer cells, resulting in a loss of its expression [18,20,21]. Conversely, an up-regulation of the expression of HS3ST3B has been observed in many cell types exposed to inflammatory stimuli, including monocytes/ macrophages, fibroblasts and endothelial cells [24,25,48,49]. Interestingly, we demonstrated that high expression of HS3ST3B was capable of compensating for the loss of HS3ST2 in pro-inflammatory macrophages, which means that 3-*O*-sulfated motifs could be synthesized in these cells, regardless the inflammatory status [24]. On another hand, HS3ST4 was found to be up-regulated in certain cancer cells by increased levels of TRF2, a key factor in telomere protection, which correlated with inhibition of the recruitment of NK cells to the tumor. Based on these findings, it is tempting to speculate that silenced expression of HS3ST2 could be compensated with the expression of another isozyme, i.e. HS3ST3B or 4, depending on the molecular signature of cancer cells and/or changes in the tumor environment [17]. On this assumption, our results reinforce the idea that certain gD-type HS3STs are key regulators of cancer pathogenicity and highlight the clinical value of these isozymes as future targets for therapeutic approaches.

Supporting information



S1 Fig. Disaccharide analysis of HS from HS3ST-transfected MDA-MB-231 cells. Purified HS from control (empty vector) and HS3ST-transfected cells were digested to disaccharides using a mixture of heparinases. Samples were labelled with AMAC, resolved by C18 RP-HPLC and detected by fluorescence. The numbers correspond to the elution positions of standard HS disaccharides. Peaks (a) and (b) corresponds to new HS products. Peak (*) corresponds to a minor AMAC-derived contaminant (note that most of excess free AMAC is strongly retained by the RP column and elutes later than AMAC-labelled disaccharides). Representative results of independent experiments conducted with two different cell preparations are shown.



S2 Fig. Comparison of the effects of HS3ST3A and HS3ST3B on colony formation and cell signaling in MDA-MB-231 cells. (A) Equal numbers of control and HS3ST-overexpressing cells (2000 per well) were seeded in six well plates and maintained for nine days in DMEM complemented with 1% FCS to form colonies. Fresh complete growth medium was then added for three days, after which the colonies were stained with crystal violet. The right panel represents the quantification of the colonies per well. Results are expressed as fold changes by comparison with control cells transfected with empty vector. Data are means \pm S.D. from five separate experiments performed independently (***) $P < 0.001$, significantly different when compared to control cells; n.s., not significantly different). (B) Twenty hours post transfection, MDA-MB-231 cells were serum-starved for 3 hours, collected and lysed. Proteins were then separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting with antibodies to I- κ B, survivin, XIAP and to the phosphorylated forms of c-Src, Akt and NF- κ B p65 subunit. Parallel immunoblotting with antibodies to GAPDH and to c-Src, Akt and NF- κ B p65 regardless of their phosphorylation status confirmed equal loading of samples. Histograms represent the quantification of the phosphorylation status of c-Src, Akt, NF- κ B p65 and of the expression of I- κ B, survivin and XIAP related to GAPDH. Data were normalized to control cells. Representative results from three independent experiments are shown.

Acknowledgements

We are grateful to Julien Cherfils-Vicini (CNRS UMR 7284/INSERM U1081, University of Nice) for kindly providing us with the vector encoding HS3ST4, Toin van Kuppevelt (University of Nijmegen, Netherlands) for anti-HS antibodies.

References

1. Esko JD, Selleck SB. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulphate. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 435-471. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135458 PMID: 12045103
2. Zhang L. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 93: 1-17. doi: 10.1016/S1877-1173(10)93001-9 PMID: 20807638
3. Turnbull J, Powell A, Guimond S. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 75-82. PMID: 11166215
4. Mochizuki H, Yoshida K, Gotoh M, Sugioka S, Kikuchi N, Kwon YD, *et al.* Characterization of a heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase-5, an enzyme synthesizing a tetrasulfated disaccharide. *J Biol Chem* 2003; 278: 26780-26787. doi: 10.1074/jbc.M801586200 PMID: 18757372
5. Thacker BE, Xu D, Lawrence R, Esko JD. Heparan sulfate 3-*O*-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol* 2014; 35: 60-72. doi: 10.1016/j.matbio.2013.12.001 PMID: 24361527
6. Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai XM, Esko JD, *et al.* A novel role for 3-*O*-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 1999; 99: 13-22. PMID: 10520990
7. Shworak NW, Liu JA, Petros LM, Zhang LJ, Kobayashi M, Copeland NG, *et al.* 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* 1999; 274: 5170-5184. PMID: 9988767
8. Zhang LJ, Lawrence R, Schwartz JJ, Bai XM, Wei G, Esko JD, *et al.* The effect of precursor structures on the action of glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-1 and the biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate. *J Biol Chem* 2001; 276: 28806-28813. doi: 10.1074/jbc.M100204200 PMID: 11375390
9. Xia GQ, Chen JH, Tiwari V, Ju WJ, Li JP, Malmström A, *et al.* 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* 2002; 277: 37912-37919. doi: 10.1074/jbc.M204209200 PMID: 12138164

10. Tiwari V, O'Donnell CD, Oh MJ, Valyi-Nagy T, Shukla D. A role for 3-*O* sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 930-937. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.056 PMID: 16259945
11. Xu D, Tiwari V, Xia G, Clement C, Shukla D, Liu J. Characterization of heparan sulphate 3-*O*-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem J* 2005; 385: 451-459. doi: 10.1042/BJ20040908 PMID: 15303968
12. O'Donnell CD, Tiwari V, Oh MJ, Shukla D. A role for heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread. *Virology* 2006; 346: 452-459. doi: 10.1016/j.virol.2005.11.003 PMID: 16336986
13. Thacker BE, Seamen E, Lawrence R, Parker MW, Xu Y, Liu J, *et al.* Expanding the 3-*O*-sulfate proteome - Enhanced binding of neuropilin-1 to 3-*O*-sulfated heparan sulfate modulates its activity. *ACS Chem Biol* 2013; 11: 971-980. doi: 10.1021/acscchembio.5b00897 PMID: 26731579
14. Vijaya-Kumar A, Salem-Gassar E, Spillmann D, Stock C, Sen YP, Zhang T, *et al.* HS3ST2 modulates breast cancer cell invasiveness *via* MAP kinase- and Tcf4 (Tcf712)-dependent regulation of protease and cadherin expression. *Int J Cancer* 2014; 135: 2579-2592. doi: 10.1002/ijc.28921 PMID: 24752740
15. Song K, Li Q, Jiang ZZ, Guo CW, Li P. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O* sulfotransferase-3B1, a novel epithelial-mesenchymal transition inducer in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2011; 12: 388-398. PMID: 21709440
16. Zhang L, Song K, Zhou L, Xie Z, Zhou P, Zhao Y, *et al.* Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-3B1 (HS3ST3B1) promotes angiogenesis and proliferation by induction of VEGF in acute myeloid leukemia cells. *J Cell Biochem* 2015; 116: 1101-1112. doi: 10.1002/jcb.25066 PMID: 25536282
17. Biroccio A, Cherfils-Vicini J, Augereau A, Pinte S, Bauwens S, Ye J, *et al.* TRF2 inhibits a cell-extrinsic pathway through which natural killer cells eliminate cancer cells. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 818-828. doi: 10.1038/ncb2774 PMID: 23792691
18. Miyamoto K, Asada K, Fukutomi T, Okochi E, Yagi Y, Hasegawa T, *et al.* Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* 2003; 22: 274-280. doi: 10.1038/sj.onc.1206146 PMID: 12527896
19. Bui C, Ouzzine M, Talhaoui I, Sharp S, Prydz K, Coughtrie MW, *et al.* Epigenetics: methylation-associated repression of heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase gene expression contributes to the invasive phenotype of H-EMCSS chondrosarcoma cells. *Faseb J* 2010; 24: 436-450. doi: 10.1096/fj.09-136291 PMID: 19812376

20. Mahapatra S, Klee EW, Young CY, Sun Z, Jimenez RE, Klee GG, *et al.* Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 2882-2895. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2090 PMID: 22589488
21. Hwang JA, Kim Y, Hong SH, Lee J, Cho YG, Han JY, *et al.* Epigenetic inactivation of heparan sulfate (glucosamine) 3-*O*-sulfotransferase 2 in lung cancer and its role in tumorigenesis. *PLoS ONE* 2013; 8: e79634. doi: 10.1371/journal.pone.0079634 PMID: 24265783
22. Mao X, Gauche C, Coughtrie MW, Bui C, Gulberti S, Merhi-Soussi F, *et al.* The heparan sulfate sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A) is a novel tumor regulator and a prognostic marker in breast cancer. *Oncogene* 2016; 35: 5043-5055. doi: 10.1038/onc.2016.44 PMID: 27041583
23. Deligny A, Denys A, Marcant A, Melchior A, Mazurier J, van Kuppevelt TH, *et al.* Synthesis of heparan sulfate with cyclophilin B-binding properties is determined by cell type-specific expression of sulfotransferases. *J Biol Chem* 2010; 285: 1701-1715. doi: 10.1074/jbc.M109.018184 PMID: 19940140
24. Martinez P, Denys A, Delos M, Sikora AS, Carpentier M, Julien S, *et al.* Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* 2015; 25: 502-513. doi: 10.1093/glycob/cwu137 PMID: 25504800
25. Sikora AS, Hellec C, Carpentier M, Martinez P, Delos M, Denys A, *et al.* Tumour-necrosis factor- α induces heparan sulfate 6-*O*-endosulfatase 1 (Sulf-1) expression in fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 80: 57-65. doi: 10.1016/j.biocel.2016.09.021 PMID: 27693418
26. Delos M, Hellec C, Foulquier F, Carpentier M, Allain F, 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. *FEBS Open Bio* 2016; 7: 133-148. doi: 10.1002/2211-5463.12145 PMID: 28174681
27. 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* 2008; 18: 483-491. doi: 10.1093/glycob/cwn028 PMID: 18378523
28. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepak T, Costello D, Crowley P, *et al.* The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer* 2010; 4: 35-41. PMID: 20697531
29. Mochizuki H, Yoshida K, Shibata Y, Kimata K. Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate: enzymatic formation and tissue distribution. *J Biol Chem* 2008; 283: 31237-31245. doi: 10.1074/jbc.M801586200 PMID: 18757372

30. Liu J, Shriver Z, Blaiklock P, Yoshida K, Sasisekharan R, Rosenberg RD. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues. *J Biol Chem* 1999; 274: 38155-38162. PMID: 10608887
31. Vanpouille C, Deligny A, Delehedde M, Denys A, Melchior A, Lienard X, *et al.* The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-*O*-sulfated N-unsubstituted glucosamine residue. *J Biol Chem* 2007; 28: 24416-24429. doi: 10.1074/jbc.M701835200 PMID: 17588944
32. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 2474-2488. doi: 10.1038/sj.onc.1203527 PMID: 10851046
33. Mitsiades CS, Mitsiades N, Koutsilieris M. The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 235-256. PMID: 15134532
34. Sánchez-Bailón MP, Calcabrini A, Gómez-Domínguez D, Morte B, Martín-Forero E, Gómez-López G, *et al.* Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Signal* 2012; 6: 1276-1286. PMID: 22570868
35. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5: pii: a006098. doi: 10.1101/cshperspect.a006098 PMID: 25833940
36. Rinkenbaugh AL, Baldwin AS. The NF- κ B pathway and cancer stem cells. *Cells* 2016; 5: pii: E16. doi: 10.3390/cells5020016 PMID: 27058560
37. Cui X, Shen D, Kong C, Zhang Z, Zeng Y, Lin X, *et al.* NF- κ B suppresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating survivin expression in vitro and in vivo. *Sci Rep* 2017; 7: 40723. doi: 10.1038/srep40723 PMID: 28139689
38. Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J* 2010; 430: 199-205. doi: 10.1042/BJ20100814 PMID: 20704571
39. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 2004; 23: 2950-1966. doi: 10.1038/sj.onc.1207558 PMID: 15077156
40. Liu J, Shworak NW, Sinay P, Schwartz JJ, Zhang L, Fritze LM, *et al.* Expression of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase isoforms reveals novel substrate specificities. *J Biol Chem* 1999; 274: 5185-5192. PMID: 9988768
41. Lawrence R, Yabe T, Hajmohammadi S, Rhodes J, McNeely M, Liu J, *et al.* The principal neuronal gD-type 3-*O*-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues. *Matrix Biol* 2007; 26: 442-455. doi: 10.1016/j.matbio.2007.03.002 PMID: 17482450
42. Nguyen TK, Arungundram S, Tran VM, Raman K, Al-Mafraji K, Venot A, *et al.* A synthetic heparan sulfate oligosaccharide library reveals the novel enzymatic action of D-

- glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-3a. *Mol Biosyst* 2012; 8: 609–614. doi: 10.1039/c1mb05221g PMID: 22116385
43. Neugebauer JM, Cadwallader AB, Amack JD, Bisgrove BW, Yost HJ. Differential roles for 3-OSTs in the regulation of cilia length and motility. *Development* 2013; 140: 3892-3902. doi: 10.1242/dev.096388 PMID: 23946439
 44. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, *et al.* Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen activated protein kinase pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 18: 813-822. doi: 10.1038/sj.onc.1202367 PMID: 9989833
 45. Bloushtain N, Qimron U, Bar-Ilan A, Hershkovitz O, Gazit R, Fima E, *et al.* Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol* 2004; 173: 2392-2401. PMID: 15294952
 46. Brusilovsky M, Cordoba M, Rosental B, Hershkovitz O, Andrade MD, Pecherskaya A, *et al.* Genome-wide siRNA screen reveals a new cellular partner of NK cell receptor KIR2DL4: heparan sulfate directly modulates KIR2DL4-mediated responses. *J Immunol* 2013; 191: 5256-5267. doi: 10.4049/jimmunol.1302079 PMID: 24127555
 47. Prud'homme GJ, Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 2012; 3: 921-939. PMID: 22948112
 48. Krenn EC, Wille I, Gesslbauer B, Poteser M, van Kuppevelt TH, Kungl AJ. Glycanogenomics: a qPCR-approach to investigate biological glycan function. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375: 297-302. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.144 PMID: 18692483
 49. Sikora AS, Delos M, Martinez P, Carpentier M, Allain F, Denys A. Regulation of the expression of heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by inflammatory stimuli in human monocytes. *J Cell Biochem* 2016; 117: 1529-1542. doi: 10.1002/jcb.25444 PMID: 26575945

III. Discussion

Sur la base de leurs homologies de séquences et de leur spécificité de substrat, les HS3STs ont été divisées en deux sous-groupes. Ainsi, HS3ST1 et HS3ST5 sont impliquées dans la génération du motif de fixation de l'AT-III. Elles sont donc responsables de l'activité anticoagulante des HS, d'où la dénomination de « HS3STs de type AT ». HS3ST2, 3A, 3B, 4, et 6 synthétisent le motif de fixation de la protéine gD du virus HSV-1 et sont donc regroupées sous la dénomination « HS3STs de type gD ». Parmi elles, HS3ST2, 3A, 3B et 4 ont récemment été décrites pour favoriser la progression tumorale (Song *et al.*, 2011 ; Birrocio *et al.*, 2013 ; Vijaya-Kumar *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015 ; Mao *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018), tandis que HS3ST2 et 3A pourraient également exercer une fonction anti-tumorale (Miyamoto *et al.*, 2003 ; Bui *et al.*, 2010 ; Hwang *et al.*, 2013 ; Mao *et al.*, 2016). Cela étant, même si la fonction de la 3-*O*-sulfatation est controversée lors des processus cancéreux, il apparaît que les modifications d'expression des HS3STs chez les cellules cancéreuses ont un impact fonctionnel important. De plus, l'effet de la surexpression de différentes enzymes dans un même modèle n'a jamais été analysé et les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus. Nous avons donc comparé les réponses induites par la surexpression transitoire des HS3ST2, 3A, 3B et 4 dans les mêmes modèles cellulaires.

La croissance tumorale est la résultante de deux mécanismes complémentaires : d'une part, les cellules prolifèrent de manière anarchique, et d'autre part, elles mettent en place des mécanismes qui leur confèrent une viabilité plus importante (Sever & Brugge, 2015). Nous avons observé que la surexpression des HS3ST2, 3B et 4 entraînait une augmentation significative de la prolifération et de la viabilité des cellules MDA-MB-231 et BT-20. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Vijaya-Kumar *et al.* (2014) et de Zhang *et al.* (2015), qui ont montré respectivement que la surexpression de HS3ST2 augmente la viabilité des cellules MDA-MB-231, et que les mêmes effets sont observés avec HS3ST3B dans les cellules U937. Nos travaux montrent également que le gain de fonction apporté par l'expression de HS3ST2, HS3ST3B ou HS3ST4 est similaire.

En revanche, nous n'avons pas observé d'augmentation de la prolifération des cellules ni de leur viabilité après surexpression de HS3ST3A. Un résultat identique a déjà été décrit dans le même modèle cellulaire (Mao *et al.*, 2016). Etant donné que chaque enzyme est bien exprimée et conduit à la production de motifs 3-*O*-sulfatés à la surface des cellules, les différences ne peuvent pas être expliquées par un défaut d'activité de HS3ST3A. Nos résultats suggèrent donc que l'impact des HS3STs de type gD sur les fonctions pro-tumorales pourrait dépendre de chaque isoenzyme. S'il a été décrit que ces enzymes reconnaissent au moins un pentasaccharide dont le résidu de IdoUA à l'extrémité non-réductrice est 2-*O*-sulfaté (Liu *et al.*, 1999 ; Mochizuki *et al.*, 2003 ; Xu *et al.*, 2005 ; Lawrence *et al.*, 2007), la composition de

la séquence du côté réducteur du site de 3-*O*-sulfatation n'est pas connue (Nguyen *et al.*, 2012). De plus, le fait que divers types cellulaires expriment plusieurs HS3STs de type gD différentes suggère fortement que ces enzymes exercent des fonctions non redondantes. En ce sens, il a été montré chez le poisson zèbre que la formation des vésicules de Kupffer était dirigée par l'action de deux HS3STs distinctes, l'une étant nécessaire au contrôle de la taille des cils quand l'autre est indispensable à leur mouvement (Neugebauer *et al.*, 2013). En accord avec cette étude, nos résultats donnent à penser qu'il existe des différences fonctionnelles entre les HS3STs de type gD, suggérant qu'elles sont impliquées dans la génération de différents motifs 3-*O*-sulfatés. Ainsi, il est probable que les HS3STs possèdent des spécificités de substrat très fines, et donc que le substrat de HS3ST3A soit présent en quantités plus faibles à la surface de nos modèles cellulaires. De même, il est envisageable que HS3ST2, 3B et 4 présentent des spécificités de substrat moins strictes que HS3ST3A, ou bien partagent plus d'accepteurs. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour définir avec précision les substrats de chaque isoenzyme.

Nous avons également testé les effets des HS3STs sur la capacité des cellules à former des colonies. Comme précédemment, nous n'avons pas observé de différences de réponses entre les trois isoenzymes. En effet, lorsque les cellules MDA-MB-231 surexpriment les HS3ST2, 3B et 4, elles forment plus de colonies et les colonies formées sont de taille plus importante, suggérant que des signaux de survie sont activés. Nous avons alors analysé l'activation de voies de signalisation régulant la prolifération et la survie. Nous n'avons pas observé d'augmentation de l'activation de ERK1/2 ni de STAT3 en présence de HS3STs, probablement en raison de la forte activation constitutive de ces voies dans notre modèle cellulaire. En revanche, la surexpression des HS3ST2, 3B et 4 entraîne une forte augmentation de l'activation de c-Src, de Akt et de la voie NF- κ B, par rapport aux cellules contrôles ou aux cellules qui surexpriment HS3ST3A. La présence de ces trois enzymes permet donc aux cellules de maintenir l'activation de ces voies en absence de stimuli externes. Il est connu que l'augmentation de l'activation de Akt, c-Src et NF- κ B favorise la progression tumorale en stimulant la survie cellulaire *via* la production de protéines anti-apoptotiques (Mitsiades *et al.*, 2004 ; Sánchez-Bailón *et al.*, 2012 ; Sever & Brugge, 2015 ; Rikenbaugh *et al.*, 2016). Nous avons donc logiquement observé une augmentation de l'expression de la survivine et de XIAP, deux membres de la famille des IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Protein*), chez les cellules surexprimant les HS3ST2, 3B et 4. Ces protéines sont fortement exprimées dans divers types de cancers et contribuent à la protection des cellules cancéreuses en inhibant l'apoptose induite par la voie mitochondriale (Cui *et al.*, 2017 ; Altieri *et al.*, 2010).

Nous nous sommes donc interrogés sur le rôle protecteur que pouvait exercer les HS3ST2, 3B et 4 sur les cellules cancéreuses lorsque les cellules sont soumises à l'induction

de l'apoptose par la staurosporine ou par un mélange composé de TNF- α et d'anticorps dirigé contre Fas. Un tel mélange induit l'apoptose cellulaire par l'activation des récepteurs de mort cellulaire. Quel que soit le traitement inducteur de l'apoptose, nous avons observé que la surexpression de l'une de ces trois enzymes désensibilise les cellules de manière importante et similaire. L'ensemble de ces données suggère donc la surexpression des HS3ST2, 3B et 4 confère aux cellules cancéreuses des capacités de survie accrues qui pourraient dépendre de l'axe NF- κ B/survivine/XIAP.

Finalement, nous avons montré que l'activité cytotoxique des cellules NK contre les cellules cancéreuses surexprimant l'une de ces trois enzymes était largement diminuée. Il est probable que ce résultat soit dû, au moins en partie, à une inhibition des récepteurs de mort cellulaire, à l'image de ce qui se produit lorsque les cellules sont stimulées par un anticorps dirigé contre Fas additionné de TNF- α . Il est aussi probable que les HS 3-*O*-sulfatés des cellules cancéreuses agissent en trans sur les cellules NK pour moduler leur activité. En effet, il a été montré que les HS portés par les cellules cibles pouvaient interagir avec certains récepteurs des cellules NK (Bloushtain *et al.*, 2004). De plus, les HS 3-*O*-sulfatés sont capables d'interagir avec le récepteur KIR2DL4 présent à la surface des cellules NK pour réguler son activation (Brusilovsky *et al.*, 2013). Cependant, d'autres travaux seront nécessaires pour déterminer si les HS 3-*O*-sulfatés sont des ligands fonctionnels et inhibiteurs des cellules NK.

Dans leur ensemble, nos résultats sont en faveur d'un modèle selon lequel les HS3STs exerceraient des fonctions pro-tumorales. Nous avons montré que la surexpression des HS3ST2, 3B et 4 en cellules MDA-MB-231 entraînait une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaires et conférait aux cellules des capacités accrues de résistance à l'apoptose induite. Ces effets sont associés à une augmentation de l'activation de c-Src, de Akt et de NF- κ B ainsi qu'à une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques que sont la survivine et XIAP. Cela étant, le mécanisme moléculaire sous-jacent n'a pas été complètement élucidé. En effet, s'il est connu que plusieurs voies de signalisations sont déjà suractivées chez les cellules MDA-MB-231, nous avons montré que la surexpression des HS3STs peut renforcer leur activation (Figure 33). Cependant, la manière dont les HS 3-*O*-sulfatés interviennent à la surface des cellules est encore incomprise, et le ou les récepteurs ou co-récepteurs impliqués restent à identifier.

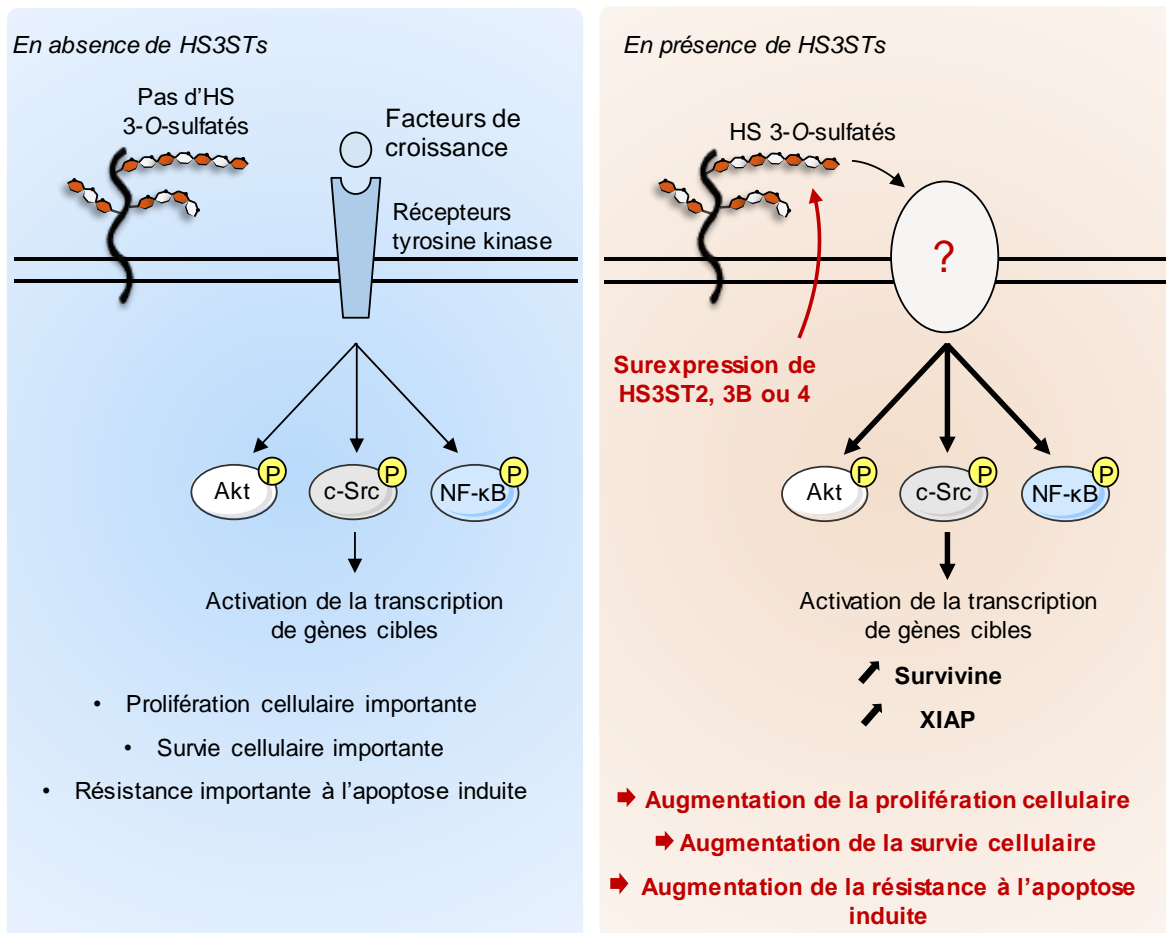


Figure 33 : Schéma récapitulatif des effets pro-tumoraux associés à la surexpression des HS3ST2, 3B et 4 dans les cellules MDA-MB-231.

PARTIE 2 : ASPECTS MOLECULAIRES DES REPONSES PRO-TUMORALES INDUITES PAR L'EXPRESSION DE HS3ST3B

Afin d'approfondir l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets pro-tumoraux des HS3STs, nous avons généré des cellules MDA-MB-231 qui surexpriment stablement HS3ST3B. Nous avons alors focalisé nos travaux sur la Nrp-1, afin de vérifier si ce co-récepteur de facteurs de croissance jouait un rôle dans les effets induits par l'expression de HS3ST3B. Partant ensuite du constat que l'expression de HS3ST3B conduit à une modification de la morphologie cellulaire, nous avons commencé une étude sur l'activation de voies de signalisation impliquées dans les mécanismes d'invasion cellulaire.

I. Implication de la neuropiline-1 dans les réponses cellulaires induites par les HS3STs

A. Introduction

1. Expression tissulaire et structure des neuropilines-1 et -2

Les Nrps sont des glycoprotéines transmembranaires de type I ayant une masse comprise entre 120 et 140 kDa. Deux Nrps distinctes ont été identifiées chez les Vertébrés, Nrp-1 et Nrp-2, codées par deux gènes distincts. La Nrp-2 existe sous deux formes provenant de deux variants d'épissage, Nrp-2A et Nrp-2B, qui présentent respectivement 44 et 15% d'homologie de séquence avec la Nrp-1. Nrp-1 et Nrp-2 sont principalement présentes sous la forme d'homodimères, bien que la formation d'hétérodimères Nrp-1/Nrp-2 soit possible. Elles sont exprimées par de nombreux types cellulaires, tels que les cellules endothéliales, les cellules des îlots de Langerhans, les neurones, les hépatocytes, les mélanocytes, les ostéoblastes et certaines sous-populations leucocytaires (Prud'homme & Glinka, 2012 ; Chaudhary *et al.*, 2014).

La partie extracellulaire des Nrps est composée de 5 domaines. Les domaines a1 et a2 sont chacun constitués par environ 110 acides aminés et présentent des homologies avec les protéines du complément C1s et C1r. Les domaines b1 et b2 sont composés chacun d'environ 150 acides aminés. Ils présentent quant à eux des homologies avec les facteurs de coagulation V et VIII. Le domaine c est impliqué dans la dimérisation, bien qu'il ne suffise pas à lui seul pour induire la formation de dimères. Les deux Nrps possèdent également un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique de moins de 50 acides aminés, lequel n'a pas de fonction de signalisation cellulaire connue mais présente une séquence de liaison aux protéines à motif PDZ. Il interagit en outre avec les chaînes lourdes de myosine et les protéines de la plaque d'adhérence focale (Figure 34) (Gu *et al.*, 2002 ; Nakamura & Goshima, 2002).

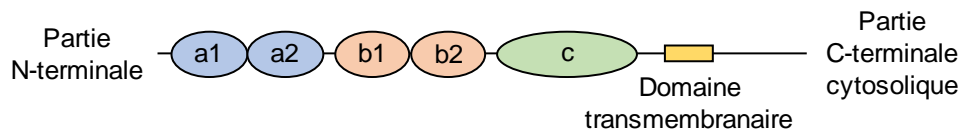


Figure 34 : Représentation schématique de l'organisation en domaines des Nrps. D'après Guttman-Raviv *et al.*, 2006.

2. Fonctions de la neuropiline-1

Les fonctions des Nrps dépendent de leurs capacités à interagir à la fois avec un ligand et son récepteur appartenant à plusieurs familles de médiateurs protéiques distincts : elles jouent notamment le rôle de co-récepteur pour les sémaphorines, les VEGFs, le TGF- β et les PDGFs. Les Nrps sont donc impliquées dans divers processus biologiques tels que la croissance des neurones, la régulation du système immunitaire, l'angiogenèse mais également la progression tumorale (Figure 35). La Nrp-1 peut également interagir avec des intégrines, la fibronectine, la galectine-1, la protéine L1-CAM et le neurotrophine R. La Nrp-2 partage des propriétés de liaisons avec des protéines qui sont aussi les ligands de la Nrp-1, même si cette dernière présente le plus large spectre d'interaction. Si les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore clairement définis, il est probable que les Nrps piègent les ligands solubles à la surface cellulaire afin d'augmenter leur disponibilité pour les récepteurs (Prud'homme & Glinka, 2012).

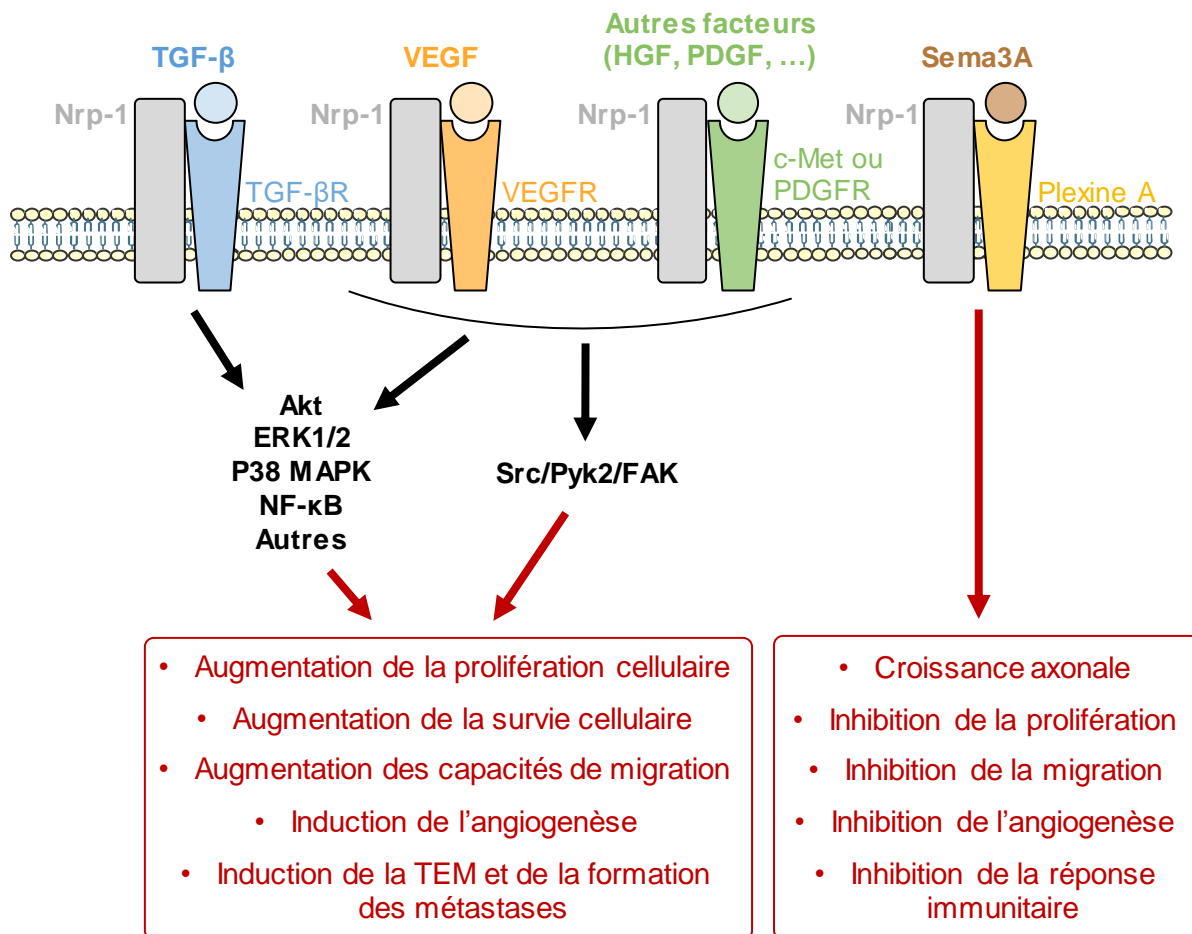


Figure 35 : Fonctions des Nrps. D'après Prud'homme & Glinka, 2012.

a. Vascularisation et croissance axonale

La Nrp-1 joue un rôle primordial lors du développement. En effet, sa déficience provoque des malformations critiques du cœur et des systèmes nerveux et vasculaires, ce qui entraîne la mort des embryons après 10 à 12 jours de développement. Il a été observé que les neurones efférents du système nerveux périphérique de ces embryons présentaient des trajectoires anormales (Kitsukawa *et al.*, 1997 ; Kawasaki *et al.*, 1999). Étonnamment, la surexpression de la Nrp-1 chez des souris transgéniques est létale pour l'embryon dès le 12^{ème} jour de développement. Les embryons chimères possèdent des capillaires et des vaisseaux sanguins dilatés mais aussi en large excès, des malformations du cœur, et une croissance anormalement importante des fibres nerveuses (Kitsukawa *et al.*, 1995). L'ensemble de ces données souligne donc la fonction clé de la Nrp-1 dans le développement du cœur, des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses.

Ces observations sont expliquées par le fait que la Nrp-1 joue le rôle de co-récepteur pour le VEGF et est donc nécessaire à son activité angiogénique (Prud'homme & Glinka, 2012). D'autre part, la Nrp-1 sert également de co-récepteur à une protéine de la famille des sémaphorines, la Sema3A (Sémaphorine A sécrétée de classe III). La Sema3A est essentiellement impliquée dans le guidage des axones et l'homéostasie des os. Elle a besoin de la Nrp-1 pour induire ses effets *via* son récepteur qui est la plexine A. En fait, la formation du complexe ternaire Sema3A/plexine A/Nrp-1 est essentielle à l'activité de la Sema3A. Une étude structurale réalisée *in vitro* a montré qu'un homodimère de Sema3A est reconnu par deux hétérodimères Nrp-1/plexine A pour conduire à la formation de deux hétérotrimères contigus (Figure 36). Par ailleurs, la Nrp-1, lorsqu'elle est en complexe avec la plexine A, présente une affinité très importante pour la Sema3A (Chaudhary *et al.*, 2012 ; Jansen *et al.*, 2012).

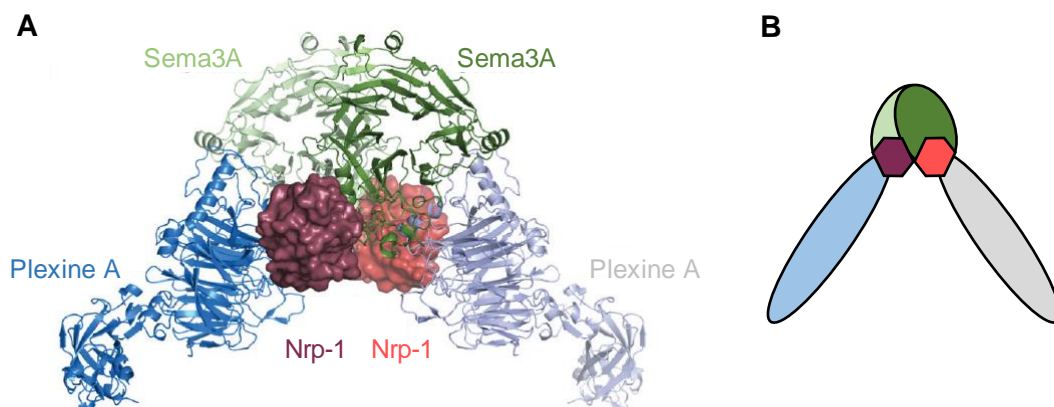


Figure 36 : Formation de deux hétérotrimères pour l'induction de la signalisation associée à Sema3A. (A) Structure des deux hétérotrimères en interaction. (B) Représentation schématique. D'après Jansen *et al.*, 2012.

b. Régulation de la réponse immunitaire

La Nrp-1 exerce une fonction immuno-régulatrice grâce à son interaction avec la Sema3A. Il a en effet été montré que l'expression d'une forme mutante de Sema3A incapable d'interagir avec la Nrp-1 favorisait l'activation des lymphocytes T (Catalano *et al.*, 2006). Par la suite, il a été décrit que la Nrp-1 était un marqueur des cellules T immuno-régulatrices chez la Souris et chez l'Homme. Grâce à l'utilisation d'un modèle animal d'encéphalite auto-immune et de délétion tissu-spécifique en Nrp-1, il a été montré que l'absence de la Nrp-1 conduisait au développement d'une inflammation associée à une augmentation de la population de lymphocytes Th17 et à une diminution des fonctions régulatrices. A l'inverse, les cellules T CD4+ exprimant la Nrp-1 induisent une diminution de la prolifération des cellules T et de leur production de cytokines, *in vivo* et *in vitro*. De manière intéressante, les effets immuno-régulateurs de la Nrp-1 sont inhibés lorsque le TFG- β est bloqué. A l'inverse, le blocage de l'IL-10 n'a pas d'effet (Solomon *et al.*, 2011). Pourtant, il a aussi été observé que la sous-population de cellules T CD4+ Nrp-1+ sécrète des quantités importantes d'IL-10 pour réguler la croissance et l'activation des autres cellules T (Catalano, 2010). Des études supplémentaires seront donc nécessaires pour mieux définir le mécanisme mis en jeu.

La Nrp-1 est également impliquée dans le développement et la différenciation des thymocytes (Corbel *et al.*, 2007 ; Mendes-da-Cruz *et al.*, 2009). De plus, elle participe à la mise en place de la synapse immunologique entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigènes (CPAg), suggérant qu'elle pourrait intervenir dans le mécanisme de présentation. En ce sens, il a été montré que le contact initial entre les CPAg et les cellules T conduisait à la polarisation de la Nrp-1 à la surface des cellules T. De plus, la pré-incubation de CPAg et de cellules T avec un anticorps bloquant dirigé contre la Nrp1 inhibe la prolifération des cellules T normalement induite par les CPAg (Tordjman *et al.*, 2002). Cependant, étant donné que la plupart des cellules T effectrices n'expriment pas la Nrp1, et que seule une sous-population de CPAg l'exprime, son rôle dans ce processus reste à définir (Prud'homme & Glinka, 2012).

3. La neuropiline-1 dans le cancer

L'expression de la Nrp-1 est augmentée dans des lignées cellulaires de carcinomes de la prostate, du sein, du rein, de la vessie, de l'œsophage, du poumon. Ses niveaux d'expression sont aussi augmentés dans des lignées cellulaires de mélanome, de glioblastome, de neuroblastome, d'ostéosarcomes et de leucémie (Bagri *et al.*, 2009). De même, elle a été retrouvée surexprimée dans des biopsies prélevées chez des patients atteints de carcinomes du pancréas, de prostate, de sein, de la vessie, du colon et du rein, de la peau, des ovaires et des poumons (Bielenberg *et al.*, 2006 ; Ellis *et al.*, 2006 ; Makhtar *et al.*, 2018). Ces données indiquent que la Nrp-1 est globalement surexprimée chez les cellules cancéreuses, ce qui est lié au développement de la maladie.

La Nrp-1 est capable d'interagir avec plusieurs facteurs de croissance favorisant la progression tumorale tels que le TGF- β , le VEGF, l'EGF, l'HGF, les PDGFs, les FGFs (Figure 35). Son impact sur la progression tumorale n'est donc pas restreint à un processus en particulier. L'augmentation de l'expression de la Nrp-1 entraîne non seulement une augmentation de la prolifération, de l'angiogenèse, de la migration, et de l'invasion, mais favorise aussi la TEM (Guttmann-Raviv *et al.*, 2006 ; Bagri *et al.*, 2009 ; Makhtar *et al.*, 2018). Par exemple, la surexpression de la Nrp-1 dans un modèle de cancer de la prostate chez le rat conduit à l'augmentation de la croissance tumorale, de la survie cellulaire et des capacités migratoires des cellules *in vivo*. Ces tumeurs présentent une forte densité en vaisseaux sanguins et des vaisseaux dilatés par rapport aux tumeurs contrôles (Miao *et al.*, 2000). L'expression de la Nrp-1 chez des cellules de cancer du sein qui ne l'expriment pas résulte en une augmentation de la survie cellulaire selon une voie dépendante du VEGF (Bachelder *et al.*, 2001). De même, des cellules de cancer du pancréas qui surexpriment la Nrp-1 possèdent des capacités invasives supérieures en réponse à une stimulation par le HGF. A l'inverse, l'inactivation de l'expression de la Nrp-1 chez des cellules pancréatiques entraîne une diminution des effets associés au HGF (Matsushita *et al.*, 2007). Pour inhiber la fonction de la Nrp-1, il est aussi possible de perturber l'interaction qu'elle établit avec ses ligands. Ainsi, l'utilisation d'un peptide masquant la zone d'interaction du VEGF avec la Nrp-1 entraîne une augmentation de la mort cellulaire et une diminution de l'invasion des cellules de cancer du sein (Barr *et al.*, 2005). Par ailleurs, la Nrp-1 intervient dans le maintien de l'état dédifférencié des cellules souches cancéreuses (Prud'homme & Glinka, 2012).

Prenant en compte l'ensemble de ces données, la possibilité d'utiliser la Nrp-1 comme marqueur pronostic a été envisagée. L'analyse de biopsies de cancer du sein a montré que la Nrp-1 était plutôt retrouvée dans les tumeurs de hauts grades. Son expression est d'ailleurs associée à un faible taux de survie (Escudero-Esparza *et al.*, 2010). Il a ainsi été montré que l'expression de la Nrp-1 était potentiellement associée à la formation de métastases et pouvait être utilisée comme marqueur de mauvais pronostic dans le cas de cancers de la prostate, du sein, de leucémie myéloïde aigüe, d'ostéosarcomes, de carcinomes à cellules squameuses, et de cancer du poumon non à petites cellules (Hong *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2013 ; Chu *et al.*, 2014 ; Zhao *et al.*, 2014 ; Tse *et al.*, 2017).

4. La neuropiline-1 et les HS

S'il est bien connu que la Nrp-1 est une glycoprotéine, il n'est que rarement fait état de son statut de protéoglycane. Il semble qu'elle puisse être modifiée par l'ajout de chaînes de GAGs selon le contexte, ce qui engendre des modulations de ses fonctions originales (Frankel *et al.*, 2008 ; Shintani *et al.*, 2008). En ce sens, une fraction mineure de Nrp-1 exprimée par les cellules endothéliales et par les cellules musculaires lisses peut porter des chaînes HS, ce

qui modifie ses capacités d'interaction avec le VEGF et son récepteur (Shintani *et al.*, 2006). De même, la Nrp-1 exprimée par des cellules de glioblastomes peut porter des chaînes CS, ce qui a alors pour conséquence l'augmentation de l'invasion cellulaire (Frankel *et al.*, 2008).

Il est en revanche établi que la Nrp-1 est capable d'interagir *in vitro* avec de l'héparine. La liaison de la Nrp-1 à l'héparine est d'ailleurs facilitée lorsque les fragments d'héparine sont plus longs, ce qui suggère qu'elle pourrait interagir avec des segments longs de chaînes HS présents à la surface des cellules (Uniewicz *et al.*, 2014). Au niveau cellulaire, il a d'ailleurs été observé que la Nrp-1 et les chaînes HS agissaient de concert pour permettre l'endocytose de nanoparticules ou bien l'entrée du virus HTLV1 (*Human T-cell lymphotropic Virus Type 1*) (Lambert *et al.*, 2009 ; Pang *et al.*, 2015). D'autre part, l'interaction de la Nrp-1 avec ses ligands peut dépendre des HS comme c'est le cas pour le VEGF165. *In vitro*, un dimère de VEGF165 interagit avec un dimère de Nrp-1. Deux fragments d'héparine établissent un lien supplémentaire pour former deux complexes ternaires VEGF165/Nrp-1/héparine (Figure 37) (Vander Kooi *et al.*, 2007). Plus précisément, il a été montré que la Nrp-1 était capable d'interagir de manière spécifique avec les HS 3-*O*-sulfatés, et cette interaction serait nécessaire à la mise en place de certaines fonctions dépendantes de la Nrp-1. En effet, l'inactivation de l'expression de HS3ST2 réduit la croissance axonale induite par l'interaction entre la Nrp-1 et la Sema3A. De manière intéressante, l'inactivation de HS3ST1 n'a pas d'effet sur le développement neuronal, indiquant potentiellement une autre différence fonctionnelle entre les HS3STs de type gD et celles de type AT. Enfin, il a été observé que les héparanes 3-*O*-sulfatés étaient plus efficaces que les HS dépourvus de groupements 3-*O*-sulfates pour inhiber les effets induits par le VEGF chez les cellules endothéliales, suggérant que la 3-*O*-sulfatation pourrait aussi favoriser les réponses associées à l'interaction entre le VEGF et la Nrp-1 (Thacker *et al.*, 2016).

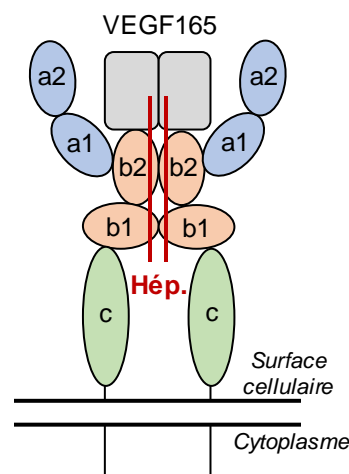


Figure 37 : Modèle structural de l'interaction entre la Nrp-1, le VEGF165 et l'héparine. Le domaine de liaison à l'héparine du VEGF interagit avec le domaine b1 de la Nrp-1, les deux protéines interagissant avec l'héparine. D'après Vander Kooi *et al.*, 2007.

5. Travaux de recherche

Il est donc connu que la Nrp-1 intervient dans la progression tumorale, interagit avec les HS et plus particulièrement avec les HS 3-*O*-sulfatés. La 3-*O*-sulfatation semble, en outre, moduler les effets associés à l'interaction entre la Nrp-1 et ses ligands. Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer si la Nrp-1 pouvait intervenir dans les effets cellulaires induits par la surexpression des HS3STs. Nous avons donc analysé son implication dans la prolifération et la survie cellulaires grâce à des expériences d'inactivation par ARN interférence réalisées chez des cellules surexprimant stablement HS3ST3B. Nous avons par la suite analysé l'effet de l'inactivation de la Nrp-1 sur l'activation des voies de signalisation précédemment identifiées comme étant suractivées par la surexpression des HS3STs.

B. Publication

"The pro-tumoral activity of heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase 3B (HS3ST3B) in breast cancer MDA-MB-231 cells is dependent on the expression of neuropilin-1"

Charles Hellec, Mariama Diawara, Mathieu Carpentier, Agnès Denys, Fabrice Allain*

University of Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59655 Villeneuve d'Ascq, Lille, France; umr-ugsf@univ-lille.fr

*Correspondence: fabrice.allain@univ-lille.fr; Tel.: +33(0)3 20 33 72 39

Abstract

Heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferases (HS3STs) catalyze the maturation step of heparan sulfate (HS) 3-*O*-sulfation. This modification is relatively rare. Moreover, only a few biological processes have been described to be influenced by 3-*O*-sulfated HS, and a little number of ligands have been identified so far. Among them, neuropilin-1 (Nrp-1) was reported to exhibit tumor-promoting properties by enhancing the action of various growth factors. We recently demonstrated that transient overexpression of HS3ST2, 3B or 4 enhanced the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells and promote efficient protection against pro-apoptotic stimuli. Hence, we hypothesized that the pro-tumoral activity of these HS3STs could be dependent on the expression of Nrp-1. To test this assumption, MDA-MB-231 cells were stably transfected with a construct encoding HS3ST3B and the expression of Nrp-1 was down-regulated by RNA interference. First, we confirmed that stable expression of HS3ST3B effectively increased cell proliferation and viability. Silencing the expression of Nrp-1 markedly attenuated the promoting effects of HS3ST3B, while the same treatment had only a moderate effect on the behavior of the parental cells. Altogether, our findings support the idea that the tumor-promoting effects of HS3ST3B could be dependent on the expression of Nrp-1 in cancer cells.

Keywords: heparan sulfate, sulfotransferase, neuropilin, cancer

Introduction

Heparan sulfate (HS) modulates the binding of a large number of ligands, resulting in the regulation of a variety of physiological and pathological processes, such as in embryonic development, homeostasis, inflammatory responses, infections, and tumor growth. Binding to HS can have many effects on the ligands, ranging from simple immobilization to induction of conformational changes, stabilization of receptor-ligand complexes or protein oligomerization. The HS-protein interactions are driven at a first level by the overall sulfation of HS motifs, and then by the spatial arrangement of sulfate groups in given sequences [1,2]. The structural diversity in HS is derived from enzymatic modifications of the glycan backbone formed of alternating D-glucuronic acid (GlcUA) and *N*-acetylated D-glucosamine (GlcNAc) units. In the classical model of HS biosynthesis, this precursor is first subject to partial *N*-deacetylation/*N*-sulfation of GlcNAc residues, which provides the pre-requisite substrate needed for the next modifications: C5 epimerization of some GlcUA into L-iduronic acid (IdoUA), 2-*O*-sulfation of uronic acid residues, mainly IdoUA, and 6-*O* and/or 3-*O*-sulfation of GlcN residues. These modifications are catalyzed by complex enzymatic machinery, including *N*-deacetylases/*N*-sulfotransferases (NDSTs), C5-epimerase and 2-*O*, 6-*O* and 3-*O*-sulfotransferases (HS2ST, HS6STs, HS3STs). To date, four NDSTs, three HS6STs and seven HS3STs have been characterized in human, the expression of these isozymes being dependent on cell type and tissue environment [2,3]. HS3STs represent the largest family of HS sulfotransferases, and still the reaction of 3-*O*-sulfation is the rarest modification within HS, compared to *N*, 6-*O*-GlcN and 2-*O*-UA sulfations [4]. HS3ST1 was described to catalyze the addition of a sulfate group to the 3-OH position of a *N*-sulfated GlcN (GlcNS) residue that is linked to a non-sulfated GlcUA residue at the non-reducing side [5,6]. HS3ST5 exhibits broader substrate specificity and transfers a sulfate group to GlcNS linked to GlcUA or IdoUA irrespective of 2-*O*-sulfation [7,8]. Both of these isozymes are involved in the generation of anticoagulant-active HS/heparin sequences, as they participate in the synthesis of the binding motifs for antithrombin-(AT)-III. HS3ST2, 3A, 3B, 4 and 6 transfer a sulfate group to the 3-OH position of GlcNS residue that is linked to an adjacent upstream 2-*O*-sulfated IdoUA. These isozymes, often referred as “gD-type” HS3STs, were reported to provide the functional HS-binding motifs for the protein gD of type I herpes simplex virus (HSV-1) and to assist viral infection [9-14].

Apart from their roles in the anti-coagulant properties of HS/heparin and the entry of HSV-1 into host cells, little is known concerning the functions of 3-*O*-sulfated motifs in other biological processes [4]. It is also worth noting that conflicting literature reported that certain HS3STs may act as either anti-oncogenic or tumor-promoting regulators. On the one hand, aberrant methylation of the genes encoding HS3ST2 and HS3ST3A was described in various cancers and tumor cells, and reversing methylation restored their expression and resulted in

the suppression of tumor cell growth [15-18]. On the other hand, HS3ST2, 3B and 4 were reported to promote cancer progression. HS3ST2 overexpression increases the viability and invasiveness of the breast cancer MDA-MB-231 cells [19]. HS3ST3B induces an epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells [20] and promotes the proliferation of acute myeloid leukemia cells [21]. Pathological expression of HS3ST4 plays a deleterious role in the escape of cancer cells from the immune system [22]. In line with these last findings, we recently demonstrated that transient expression of HS3ST2, 3B and 4 enhances the proliferation of MDA-MB-231 cells and promotes an efficient protection against cell death, which suggests that these isozymes may display a prominent role in breast cancer expansion [23].

To date, hundreds of HS-binding proteins have been identified, but only a few ligands are known to selectively interact with 3-*O*-sulfated HS motifs [4]. Among them, neuropilin-1 (Nrp-1) was recently described as a preferential ligand for HS3ST2-modified HS [24]. Nrp-1 is a transmembrane glycoprotein, initially identified in neuronal and endothelial cells as a co-receptor for semaphorins and vascular endothelial growth factors (VEGF). Importantly, it is also expressed in a number of epithelial cancer cells, wherein it contributes to cell growth, migration, invasion and survival by interacting with a large number of growth factors and their cognate signaling receptors [25-29]. Hence, we hypothesized that the functional impact of HS3ST3B expression in MDA-MB-231 cells could be related to the presence of Nrp-1. To test this assumption, MDA-MB-231 cells were stably transfected with a construct encoding HS3ST3B and the expression of Nrp-1 was knocked down by RNA interference. Altogether, our findings suggest that the tumor-promoting effects of HS3ST3B are dependent on the expression of Nrp-1 in cancer cells.

Results

Expression of HS3ST3B by stable transfection in MDA-MB-231 cells

Following transfection with the expression vector encoding human HS3ST3B, twenty individual G418-resistant colonies were isolated by limiting dilution and the expression of HS3ST3B transcripts was analyzed by RT-PCR (Figure 1A). As described in [23], the level of HS3ST3B expression is very low in the parental MDA-MB 231 cells. A strong overexpression was observed in 18 of the resistant clones, with a 160 to 700-fold increase in the levels of mRNA encoding the isozyme. For next experiments, we decided to retain the clones C and D, because of a medium level of expression of HS3ST3B ($\times 250$ and $\times 480$ respectively).

To confirm that HS3ST3B was efficiently produced in both these clones, cells were fixed, permeabilized and then incubated with an anti-HS3ST3B antibody. Thereafter, they were incubated with secondary antibody conjugated with Alexa-568. The fluorescence signal was analyzed by confocal microscopy. As shown in Figure 1B, the enzyme could be visualized in

both clones, while it was not detectable in the parental cells. We also checked that HS3ST3B was active in stably transfected MDA-MB-231 cells. A recombinant form of HSV-1 gD has been already used to characterize the interaction of the viral glycoprotein with HS3ST-modified HS [8-11] and to visualize its binding to the surface of cells that had been transfected with constructs encoding HS3ST2 and 3B [30]. Hence, we used here the binding of recombinant HSV-1 gD as a read-out to verify that the stable expression of HS3ST3B resulted in the production of a functional enzyme in MDA-MB-231 cells. As expected, we found that HSV-1 gD binding could be visualized with HS3ST3B expressing cells, while we did not observe any binding of HSV-1 gD to parental cells. (Figure 1B).

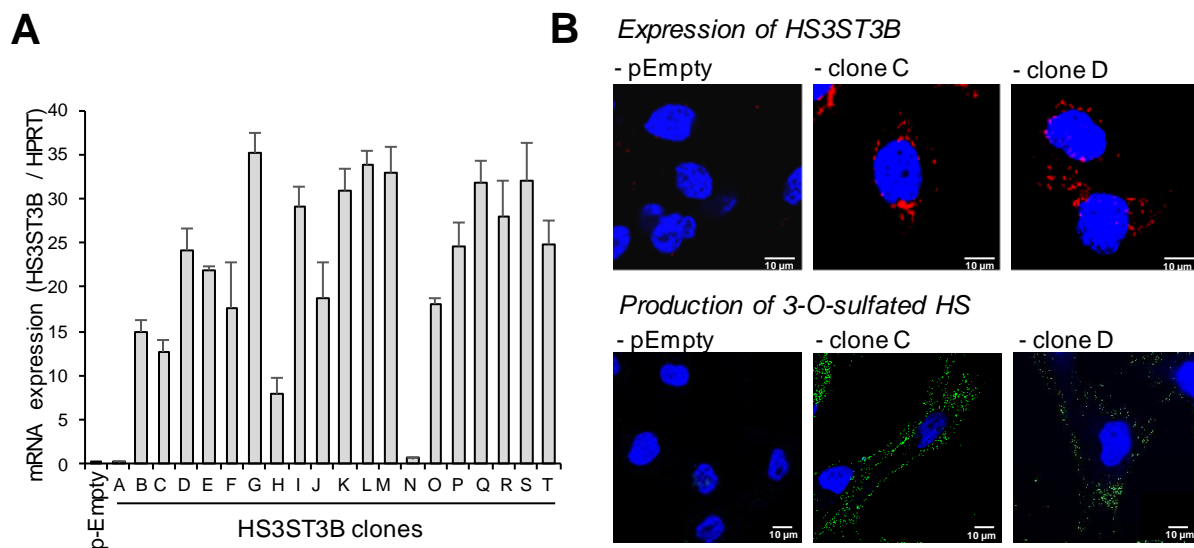


Figure 1. Stable expression of HS3ST3B in MDA-MB-231 cells. Cells were transfected with the expression vector encoding HS3ST3B and then cultured in complete DMEM medium in the presence of 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418. After 14 days of culture, individual G418-resistant colonies were isolated by limit dilution and amplified in medium supplemented with 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418. In parallel, cells were transfected with the empty vector to obtain control parental cells (pEmpty). **(A)** Following RNA extraction, the mRNA level of HS3ST3B was quantified by real-time RT-PCR in each clone. Relative abundance of the transcripts was normalized to endogenous HPRT mRNA. Data are means \pm SD of triplicates. **(B)** HS3ST3B expression in clones C and D was analyzed by confocal microscopy. To this end, cells were seeded on glass coverslips, permeabilized and then incubated in the presence of anti-HS3ST3B antibodies. After wash, they were immunostained with secondary antibodies conjugated to Alexa-568, in order to highlight the enzyme in red fluorescence. For the detection of 3-O-sulfated HS, recombinant HSV-1 gD (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was incubated with primary anti-gD antibody for 30 min at 4°C, and the immune complex was added to cells for an additional 30 min-incubation. After washing, cells were fixed and incubated for 1 h with Alexa 488-conjugated secondary antibody (green fluorescence). In all the microscopy experiments, nuclei were stained in blue with DAPI, in order to visualize cell nuclei ($N = 3$ separate experiments; $n = 30$ cells). Scale bar = 10 μm .

Effect of stable expression of HS3ST3B on the proliferation and viability of MDA-MB-231 cells

One of the principal hallmarks of cancer cells is their uncontrolled growth, which results in increased proliferation and viability. In previous works, we demonstrated that transient expression of HS3ST3B resulted in a significant increase in the growth of MDA-MB-231 cells

[23]. Hence, we tested whether stable expression of the enzyme had similar enhancing effects on cell proliferation and viability. When compared with the MDA-MB-231 cells transfected with an empty plasmid, we found that the rates of proliferation of the clones C and D were similarly increased after 24 h and 48 h of culture in the presence of 1% fetal calf serum (FCS), without any notable difference between both clones ($\times 1.6$ as compared with the control cells) (Figure 2A). Similar enhancement in the viability of the HS3ST3B expressing cells was observed. The rates of cell viability had more than doubled at 24 h and 48 h of culture with 1% FCS, as compared with the control cells (Figure 2B). Finally, we analyzed the colony forming capacity of HS3ST3B expressing cells. The ability of individual cancer cells to grow into colonies is indeed a consequence of the activation of survival signals leading to enhanced cellular viability. As shown in Figure 2C, stable transfection with the HS3ST3B expression vector resulted in more than a 10-fold increase in the colony forming capacity of MDA-MB-231 cells, as compared with the parental cells. Moreover, no significant difference could be observed between the clones C and D. Altogether, these first results confirmed that the stable expression of HS3ST3B was efficient to enhance the growth of MDA-MB-231 cells.

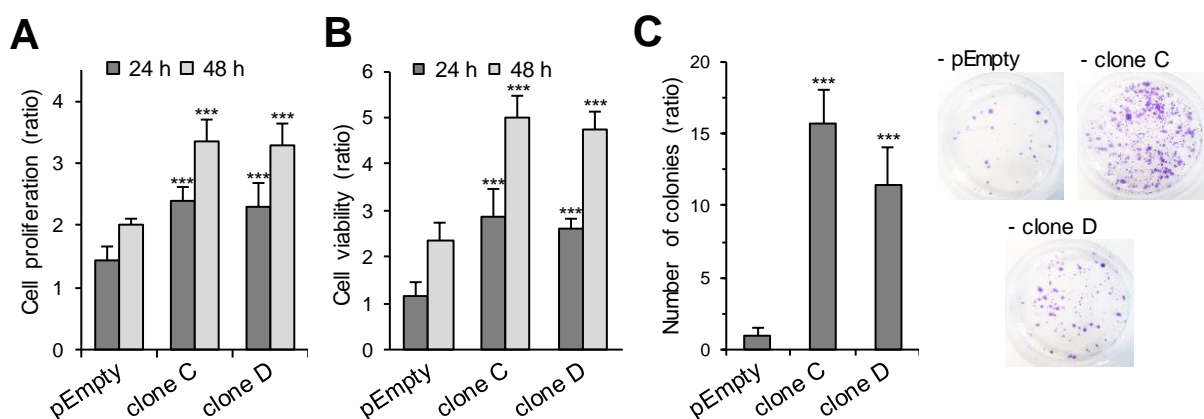


Figure 2. Effect of stable expression of HS3ST3B on the growth and survival of MDA-MB-231 cells. Parental (pEmpty) and HS3ST3B expressing (clones C and D) cells were cultured with 1% FCS for 24 and 48 h. At each time, the effect of HS3ST3B expression on the growth of MDA-MB-231 cells was estimated by (A) cell counting and (B) MTS assay. Results are expressed as fold changes by comparison with the cells that have been initially added into the wells. Data are means \pm S.D. from three separate experiments performed independently (** $P < 0.001$, significantly different when compared to control cells). (C) Equal numbers of parental and HS3ST3B expressing cells were seeded in six well plates (2000 per well) and maintained for nine days in DMEM complemented with 1% FCS, after which time the colonies were stained with crystal violet. The left panel represents the quantification of the colonies per well. Results are expressed as fold changes by comparison with control cells transfected with empty vector. Data are means \pm S.D. from three separate experiments performed independently (** $P < 0.001$, significantly different when compared to control cells).

Participation of Nrp-1 to the enhancing effect of HS3ST3B on MDA-MB-231 cell growth

Thacker *et al.* [24] reported that Nrp-1 preferentially interacts with 3-*O*-sulfated HS. Hence, we sought to determine whether the functional impact of HS3ST3B could be linked to the expression of Nrp-1 in MDA-MB-231 cells. To decipher the relationships between both molecules, we decided to silence the expression of Nrp-1 by RNA interference. Treatment of the parental MDA-MB-231 cells and the clones C and D with a specific siRNA targeting Nrp-1 (siNrp-1) resulted in a significant decrease in the levels of corresponding mRNA. After 24 h of treatment, the inhibitory effects of siRNA were estimated at more than 90%, when compared to the results obtained with the negative control siRNA (siCtrl) (Figure 3A). Moreover, knockdown of the Nrp-1 mRNA was accompanied by a loss of the Nrp-1 protein, as shown by Western blot (Figure 3B), thus validating the siRNA used in this study.

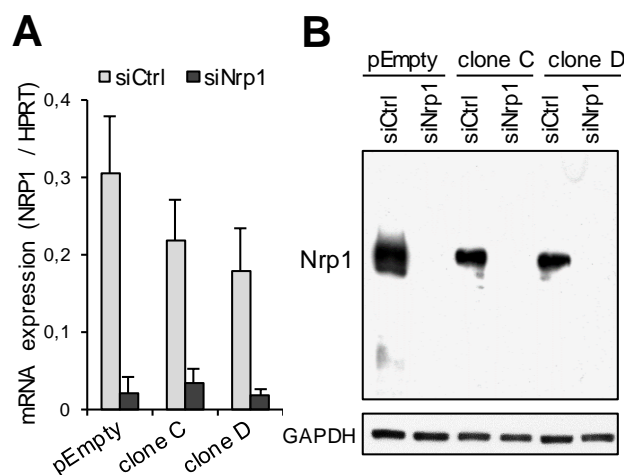


Figure 3. Knockdown of the expression of Nrp-1 in MDA-MB-231 cells by RNA interference. Cells were transfected with negative control siRNA (siCtrl) or specific siRNA targeting Nrp-1 (siNrp-1). **(A)** After 24 h of treatment, the levels of mRNA encoding Nrp-1 were determined by real-time RT-PCR. Relative abundance of the transcripts was normalized to endogenous HPRT mRNA. Data are means \pm SD of triplicates. **(B)** The efficacy of specific siRNA to knockdown the expression of Nrp-1 was verified by Western blot 48h post-transfection. Parallel immunoblotting with anti-GAPDH confirmed equal loading of the samples. Data are representative of three independent experiments.

We next examined the effect of HS3ST3B on the proliferation rates of siRNA-treated cells (Figure 4A). As expected, cell treatment with siCtrl had no inhibitory effect on the functional impact of HS3ST3B expression. The proliferation rates of the clones C and D were indeed increased after 24 h and 48 h of culture in the presence of 1% FCS, as compared with the parental cells. In contrast, silencing the expression of Nrp-1 significantly attenuated the promoting effect induced by HS3ST3B expression. Interestingly, we did not observe any notable difference in the cell proliferation rates between the parental and HS3ST3B expressing cells that have been treated with siNrp-1, suggesting that silencing the expression of Nrp-1 reversed the advantage given by HS3ST3B expression on cell proliferation. Then, we analyzed

the effect of siRNA treatment on the colony forming capacity of MDA-MB-231 cells (Figure 4B). We confirmed that HS3ST3B-mediated increase in cell viability was not altered by treatment with the siRNA control. Indeed, HS3ST3B expression resulted in more than an 8-fold increase in the colony forming capacity of the clones C and D, as compared with the parental cells. In contrast, silencing the expression of Nrp-1 resulted in a dramatic loss of viability in HS3ST3B expressing cells, which indicates that the absence of Nrp-1 also altered the enhancing effect of HS3ST3B on cell survival.

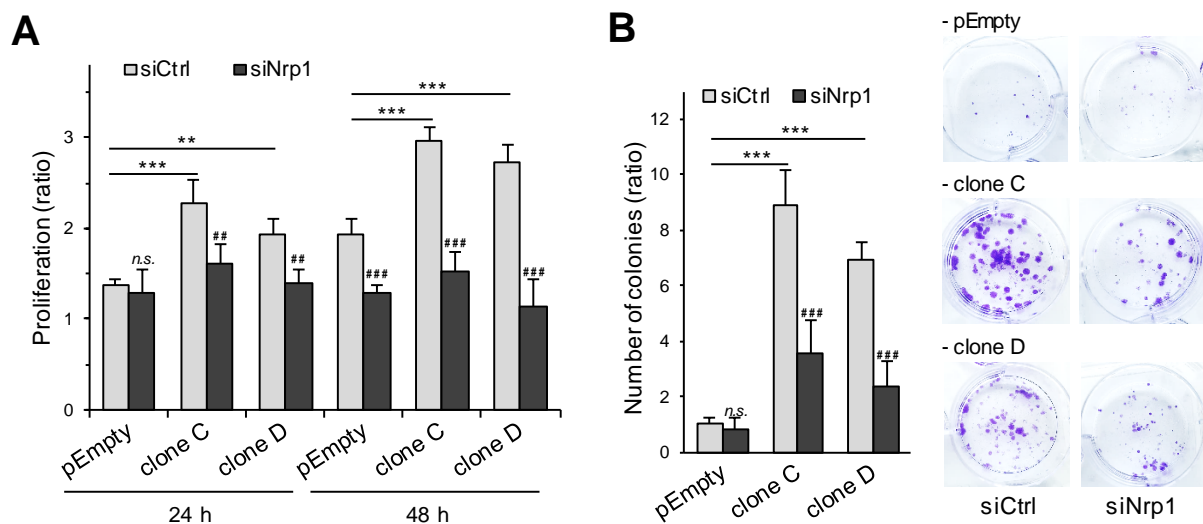


Figure 4. Effect of Nrp-1 silencing on HS3ST3B-mediated cell proliferation and survival. Parental (pEmpty) and HS3ST3B expressing (clones C and D) cells were transfected with siRNA targeting Nrp-1 (siNrp-1) or negative control siRNA (siCtrl) and then cultured for 24 h in complete medium. **(A)** After wash, cells were collected and cultured in medium containing 1% FCS for 24 h and 48 h. At each time, the effect of HS3ST3B expression on the proliferation of MDA-MB-231 cells was estimated by cell counting. Results are expressed as fold changes by comparison with the cells that have been initially added into the wells. Data are means \pm S.D. from three separate experiments performed independently (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different when compared to parental cells; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, significantly different when compared to siCtrl-treated cells; n.s. not significantly different). **(B)** Cells were seeded in six well plates (2000 per well) and cultured for nine days in the presence of 1% FCS, after which the colonies were stained with crystal violet. The left panel represents the quantification of the colonies per well. Results are expressed as fold changes by comparison with parental cells that have been transfected with siCtrl. Data are means \pm S.D. from three separate experiments performed independently (*** $P < 0.001$, significantly different when compared to parental cells; ### $P < 0.001$, significantly different when compared to siCtrl-treated cells; n.s. not significantly different).

Participation of Nrp-1 to HS3ST3B-mediated protection against cell death

We previously shown that transient expression of HS3ST3B was effective to reduce cell death in MDA-MB-231 cells exposed to pro-apoptotic stimuli [23]. To determine whether this protective effect could be related to the expression of Nrp-1, HS3ST3B-transfected cells were treated with either siCtrl or specific siNrp-1 and then exposed to a mixture containing an anti-Fas antibody and TNF- α (Figure 5). We used these reagents in order to mimic the delivery of extracellular death signals mediated by a TNF receptor and the Fas antigen [31]. In the first experiment, cell viability was analyzed without the pro-apoptotic treatment. As expected, we

confirmed that HS3ST3B-mediated increase in cell viability was not altered by treatment with the siRNA control. We found indeed that the stable expression of HS3ST3B resulted in a 2-fold increase in cell viability of the clones C and D, as compared with the parental cells. In contrast, silencing the expression of Nrp-1 strongly reduced the enhancing effect induced by HS3ST3B, while it had only a minor effect on the viability of the parental cells. Moreover, no notable difference in the rates of cell viability could be observed between the parental and HS3ST3B expressing cells that have been treated with siNrp-1 (Figure 5), which further supports the idea that silencing Nrp-1 altered the functional impact of HS3ST3B expression in MDA-MB-231 cells. In the next experiment, cells were treated with a mixture of anti-Fas/TNF- α in order to induce cell death. As expected, we found that exposure of the parental cells to the pro-apoptotic stimuli reduced the rate of cell viability by more than half, regardless of treatment with either siCtrl or siNrp-1. In contrast, the expression of HS3ST3B efficiently attenuated the loss of cell viability induced by the pro-apoptotic stimuli in siCtrl-treated cells. When compared with the non-exposed cells, we found that the rates of cell viability were only reduced by 25% and 15% in the clones C and D respectively, indicating that HS3ST3B was effective for protecting MDA-MB-231 cells against apoptosis. Conversely, silencing the expression of Nrp-1 in HS3ST3B expressing cells resulted in a dramatic loss of viability down to a level comparable to those in the parental cells after exposure to the mixture of anti-Fas/TNF- α (Figure 5). Thus, these last results indicate that the absence of Nrp-1 abolished the protective effect of HS3ST3B on MDA-MB-231 cells against apoptotic stimuli.

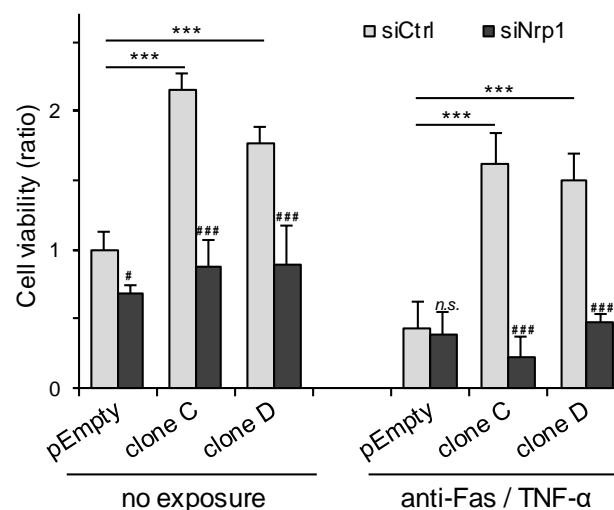


Figure 5. Effect of Nrp-1 silencing on HS3ST3B-mediated protection against apoptosis. Parental (pEmpty) and HS3ST3B expressing (clones C and D) cells were transfected with siNrp-1 or siCtrl and then cultured for 24 h in complete medium. After wash, cells were collected and cultured in medium containing 1% FCS in the absence (control) or presence of a mixture of anti-Fas antibody (100 ng/mL) and TNF- α (100 ng/mL) for 24 h. Thereafter, the number of viable cells was estimated by using MTS assay. Results are expressed as fold changes by comparison with parental cells that have been transfected with siCtrl and cultured in the absence of pro-apoptotic stimulus. Data correspond to means \pm S.D. from three independent experiments (***P < 0.001, significantly different when compared to parental cells; #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001, significantly different when compared to siCtrl-treated cells; n.s., not significant).

Role of Nrp-1 in the activation of Akt and Src in HS3ST3B expressing cells

Sustained activation of Akt and Src has been associated with an increase in tumor cell growth and enhancement of pro-survival signals [32,33]. To explore the functional impact of HS3ST3B expression on the activation of these kinases, the parental MDA-MB-231 cells and the clones C and D were cultured in the absence of serum for 8 h. In this time-course experiment, cells were collected every 2 hours and the phosphorylation status of Akt and Src was analyzed by Western blot. The levels of phosphorylated forms of both Akt and Src decreased gradually over time in the parental cells (Figure 6A). These results were as expected given the deprivation of mitogen stimulation after serum starvation. In contrast, the activation of Akt and Src in HS3ST3B expressing cells was not modified throughout the experiments, as demonstrated by the sustained and persistent phosphorylation of both kinases (Figure 6A). These results suggest that the stable expression of HS3ST3B probably favored the activation of an autocrine mechanism, which maintained long-term activation of intracellular signaling pathways even in the absence of external stimuli.

Then, we sought confirmation whether Nrp-1 was involved in increased activation of Akt and Src in HS3ST3B expressing cells. To this end, cells were pre-treated with siRNAs and then serum-starved for 2 h, after which time the phosphorylation status of both kinases was analyzed by Western blot. Silencing Nrp-1 in the parental cells had no significant effect on the phosphorylation level of Akt (Figure 6B), indicating that the basal activation of the kinase is likely not dependent on Nrp-1. In contrast, the same treatment efficiently reduced the activation of Akt in HS3ST3B expressing cells. The remnant level of Akt phosphorylation was similar to that observed in the parental cells, which suggests that the enhancing effect of HS3ST3B on the activation of Akt relied upon the expression of Nrp-1. Unlike Akt, the Src activation appeared dependent on the expression of Nrp-1. Indeed, the loss of Nrp-1 in the parental cells resulted in a strong reduction in the phosphorylation level of Src (Figure 6B). A similar reduction was observed in the clones C and D, indicating that Nrp-1 is also necessary to support the HS3ST3B-mediated activation of Src.

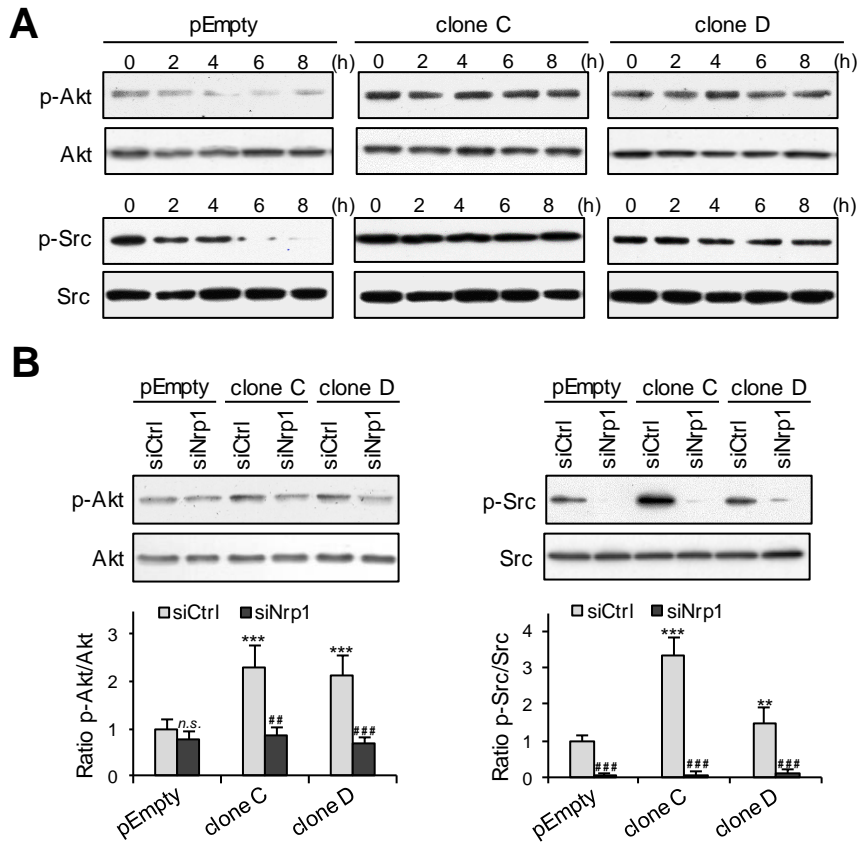


Figure 6. Effect of Nrp-1 silencing on HS3ST3B-mediated activation of Akt and Src kinases. Parental (pEmpty) and HS3ST3B expressing (clones C and D) cells were transfected with siRNA targeting Nrp-1 (siNrp-1) or negative siRNA (siCtrl) and then cultured for 24 h in complete medium. **(A)** After wash, cells were cultured in the absence of FCS for 8 h. Every two hours, cells were collected and lysed. Proteins were then separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting with antibodies to the phosphorylated forms of Akt and Src. Parallel immunoblotting with antibodies to Akt and Src regardless of their phosphorylation status confirmed equal loading of samples. Representative results from three independent experiments are shown. **(B)** Parental and HS3ST3B expressing (clones C and D) cells were transfected with siRNAs as above. After serum starvation for 2 h, the phosphorylated forms of Akt and Src was detected in cell lysates by Western blot. Parallel immunoblotting with anti-Akt and anti-Src antibodies confirmed equal loading of the samples. Representative results from three independent experiments are shown. Histograms represent the quantification of the phosphorylation status of Akt and Src. Data were normalized to parental cells that have been transfected with siCtrl (**P < 0.01, ***P < 0.001, significantly different when compared to parental cells; ###P < 0.01, ####P < 0.001, significantly different when compared to siCtrl-treated cells; n.s., not significant).

Discussion

In normal physiological conditions, Nrp-1 is expressed by a variety of cell types, including endothelial cells, neurons, macrophages and some T cell subsets. It was first identified as a receptor for the class 3 semaphorins, which are involved in axonal guidance in embryonic development. Subsequently, it was found to interact with several members of the VEGF family and to promote angiogenesis. In view of this, Nrp-1 was considered as a co-receptor for semaphorin-3 and VEGF family members [26-28]. Interestingly, heparin was reported to markedly increase the affinity of VEGF for Nrp-1 and to contribute to the formation of a complex incorporating Nrp-1, VEGF and its receptors [34,35]. Consistent with this observation,

Thacker et al. [24] recently demonstrated that Nrp-1 interacts preferentially with 3-*O*-sulfated HS. They used a classical approach based on affinity chromatography and salt elution. To this end, HS lacking 3-*O*-sulfate groups was modified by recombinant HS3ST2 and coupled to chromatography resin. Then, they validated the importance of 3-*O*-sulfation in the functions of Nrp-1 in binding assays and by showing that Nrp-1-dependent axonal growth cone collapse was dependent on the expression of HS3ST2. They also demonstrated that 3-*O*-sulfated HS were more potent than HS chains lacking 3-*O*-sulfate groups in the inhibition of VEGF-mediated endothelial sprouting. Thus, it can be concluded from their results that 3-*O*-sulfation resulted in the generation of biologically active motifs for Nrp-1. In addition to semaphorin-3 and VEGF family members, Nrp-1 was described as a co-receptor for a broad spectrum of ligands, including transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), hepatocyte growth factor (HGF), platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF) and their respective signaling receptors. Moreover, accumulating evidence has associated Nrp-1 expression in cancer cells with tumor progression [25-29]. High levels of Nrp-1 have been associated with poor outcome in patients with cancers of various origins and correlated with invasive behavior and metastatic potential. On the other hand, Nrp-1 expression was found upregulated in epithelial cells upon neoplastic transformation [36]. These observations suggested that Nrp-1 overexpression in cancer cells may lead to the acquisition of a functional advantage at the cellular level. Notably, silencing Nrp-1 expression in carcinoma cells was shown to impair proliferation, survival and invasion in vitro, while Nrp-1 overexpression can inhibit cancer cell apoptosis. These effects have been explained by the role of Nrp-1 in supporting the activation of signaling pathways elicited by a variety of growth factors, such as VEGF, EGF, HGF and PDGF [26,27,36-38].

We demonstrated here that MDA-MB-231 cells carrying HS3ST3B expression displayed a significant increase in cell proliferation and survival in culture. Complementary to this, we found that the stable expression of HS3ST3B resulted in sustained and persistent activation of Akt and Src in serum-starved cells, suggesting an autocrine mechanism of cell activation. Such an aberrant activation of Akt and Src has been reported to favor tumor growth and to enhance the resistance to apoptosis [32,33]. We have reproduced the same experiments with cells into which the expression of Nrp-1 was knocked-down by RNA interference. We found that silencing the expression of Nrp-1 strongly reduced the proliferation and viability of HS3ST3B expressing cells, while the same treatment had only a moderate effect on the parental cells. Moreover, Nrp-1 knockdown resulted in a dramatic loss of the resistance of HS3ST3B expressing cells exposed to pro-apoptotic stimuli, which means that the absence of Nrp-1 abolished the protective effect of HS3ST3B. Finally, we found that the activation of Akt and Src was reduced in HS3ST3B expressing cells to a similar level to that observed in the parental cells upon Nrp-1 silencing. Altogether, these results suggest that the tumor-promoting effects of HS3ST3B

could be related to the role of Nrp-1 in the formation of signaling complexes with growth factors and their cognate receptors.

In endothelial cells, HS was shown to regulate VEGF activity not only by binding VEGF directly but also by interacting with its signaling receptors and Nrp-1. Thus, much work has been done to understand the role of HS in the formation of signaling complexes [39]. Specifically, Teran & Nugent [35] proposed that Nrp-1, VEGF and its receptors act synergistically with cell surface HS to form high-affinity signaling complexes. They showed that the ability of Nrp-1 to influence VEGF activity was eliminated by chlorate treatment. This inhibition could be rescued by the addition of heparin, which supports the model whereby the interactions between Nrp-1, VEGF and its signaling receptors are dependent on the presence of HS. Thus, it was proposed that HS could act by facilitating the interactions between Nrp-1, VEGF and its receptors and/or by stabilizing the signaling complexes [35]. Taking these findings together, it is tempting to hypothesize that HS3ST3B-modified HS could act by enhancing the interactions between Nrp-1, growth factors and their receptors in cancer cells. Accordingly, 3-*O*-sulfated HS might facilitate the formation of the signaling complexes, and/or reinforce the interactions between Nrp-1 and its binding partners. Further investigations are currently in progress to decipher the molecular interactions between HS3ST3B-modified HS, Nrp-1 and growth factors in MDA-MB-231 cells.

In our previous works, we reported that overexpression of HS3ST3B in MDA-MB-231 cells resulted in the production of HS containing 3-*O*-sulfated disaccharides [23]. Among them, the tetrasulfated HexUA2S-GlcNS3S6S unit was already described as a major product of HS3ST3 isozymes [40]. Because the binding properties of HS/heparin are primarily driven by the interactions between positively charged amino acid residues in protein ligands and negatively charged sulfate groups in HS sequences, it could be argued that increase in HS 3-*O*-sulfation may lead to non-specific interaction. Nevertheless, we did not observe any increase in the overall sulfation level of HS purified from HS3ST3B expressing cells, as compared with the parental cells [23]. On the other hand, 3-*O*-sulfation can have a profound biological effect without inducing high affinity binding sites for the protein ligands. Indeed, ectopic expression of HS3STs in CHO cells, which are normally resistant to HSV-1 infection, resulted in a strong increase in the susceptibility to viral infection, even though the affinity of HSV-1 gD for 3-*O*-sulfated HS is relatively low ($\sim 2 \mu\text{M}$) [4, 9-14].

In the literature, the reaction of 3-*O*-sulfation has been often considered as the last modification in HS biosynthesis. This statement arises from the observations that: 3-*O*-sulfation is a rare modification compared to *N*-, 6-*O*- and 2-*O*-sulfations; HS3STs can produce a tetrasulfated disaccharide as a major product from HS/heparin; the acceptor substrates are already modified at other positions by NDST, HS2ST and C5 epimerase. In this scenario, the

reaction of 6-*O*-sulfation is thought to be dispensable [3,40]. In their recent work, Wang *et al.* [41] reexamined the substrate specificity of HS3ST1 and HS3ST3. They found that HS3ST1 preferentially modifies 6-*O*-sulfated disaccharide units. Thus, for the synthesis of oligosaccharides containing the GlcA-GlcNS3S6S disaccharide unit, the 3-*O*-sulfation by HS3ST1 has to be performed after the 6-*O*-sulfation step. In contrast, they found that HS3ST3 exhibits a preferential activity towards oligosaccharides without 6-*O*-sulfation. However, the tetrasulfated IdoUA2S-GlcNS3S6S unit was described as one of the major product of HS3ST3 [40]. Hence, the substrate requirements of HS3ST3 imply that 3-*O*-sulfation reaction occurs prior to the 6-*O*-sulfation step in the synthesis of this disaccharide unit. These findings raise the possibility that 3-*O*-sulfated motifs might be synthesized through different pathways [41].

There is conflicting evidence in the literature regarding the role of HS3STs in cancer. Hyper-methylation of the genes encoding HS3ST2 and HS3ST3A was described in a number of cancer cells. Reversing methylation restored the expression of these isozymes and resulted in the suppression of tumor cell growth, suggesting anti-oncogenic properties [15-18]. Conversely, we and others demonstrated that forced expression of HS3ST2 resulted in an increase in the proliferation and viability of MDA-MB-231 cells [19,23]. We also showed that HS3ST3B and HS3ST4 shared with HS3ST2 the same promoting effects, which revealed that the expression of these isozymes had similar functional impact on cancer cell behavior. Hence, these observations suggested that the loss of expression of one HS3ST could be compensated with the expression of another one, depending on the molecular signature of cancer cells and on tumor environment. Notably, upregulation of the expression of HS3ST3B has been observed in many cell types exposed to inflammatory and immune stimuli [42-45]. During cancer progression, developing tumor cells are exposed to pro-inflammatory and immunomodulatory cytokines that enhance immune anti-tumoral responses. In order to evade this immune pressure, tumor cells change their intrinsic features and modify their microenvironment, which result in the emergence of cellular variants with a less immunogenic phenotype and an aberrant activation of oncogenic pathways that endows them with enhanced properties to survive and proliferate [46]. Accordingly, these findings raise the hypothesis that increasing the expression of HS3ST3B in cancer cells could be a potential escape mechanism that reduces the anti-tumoral pressure exerted by the immune system. This notion is in agreement with recent data showing high expression of HS3ST3B in non-small cell lung cancer biopsies, while it was weakly expressed in matched normal tissues [47].

In conclusion, we demonstrated that HS3ST3B enhances the proliferation and survival of breast cancer MDA-MB-231 cells, *via* a mechanism that is dependent on Nrp-1. These findings reveal a new pathway that links 3-*O*-sulfated HS and Nrp-1 in cancer expansion and highlight the clinical value of HS3ST3B as a future target for therapeutic approaches.

Materials and Methods

Materials

Antibodies to human HS3ST3B and Nrp-1 were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Antibodies to phospho-Akt(S⁴⁷³), total Akt, phospho-Src(Y⁴¹⁶), total c-Src, and secondary antibodies conjugated to HRP were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Secondary antibodies conjugated to Alexa-488 (green fluorescent dye) and to Alexa-568 (red fluorescent dye) were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Recombinant HSV-1 gD protein and antibody to HSV-1 gD (clone 1.3) were obtained from Antibodies-online (Aachen, Germany) and Abcam (Cambridge, UK), respectively. Antibody to GAPDH was from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Other chemicals were from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) unless otherwise specified.

Cell culture and transfection

Human breast cancer MDA-MB-231 cells (ATCC® HTB-26™) were routinely cultured at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FCS (Lonza, Verviers, Belgium), in an atmosphere containing 5% CO₂. Construction of the plasmid encoding human HS3ST3B has been described in [23]. Transfection was performed with Lipofectamine® 2000, according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher), after which cells were cultured in culture medium in the presence of 400 µg/mL G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After 14 days of culture, G418-resistant colonies were isolated by limiting dilution and then amplified in culture medium supplemented with 400 µg/mL G418. In parallel, MDA-MB-231 cells were transfected with the empty pcDNA3.1 vector (Thermo Fisher) to obtain the control parental cells.

Measurement of cell proliferation and viability

Cells were plated at 5×10^4 cells/mL in 4 mL of DMEM supplemented with 1% FCS and cultured for 24 h or 48 h. At each time, cells were collected and counted with Trypan Blue to exclude dead cells. In parallel, cell viability was analyzed by using the Cell-Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, Fitchburg, USA), as described in [23]. Briefly, 2×10^3 cells were plated in 200 µL culture medium. After 24 or 48 h of culture, 20 µL of the MTS/PMS (95:5, v/v) solution was added to each well and the reaction was developed at 37°C for 1 h. Absorbance was measured at 490 nm using a BioTek Epoch microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, USA). In some experiments, cell apoptosis was induced by the addition of 100 ng/mL of anti-Fas antibody (Merck, Darmstadt, Germany) and 100 ng/mL TNF-α (PeproTech, Rocky Hill, USA) for 24 h. Thereafter, the number of remaining viable cells was estimated by using the MTS/PMS reagents.

Colony formation assay

Cells (2×10^3 per point) were seeded in six-well plates and cultured in the presence of 1% FCS for 9 days. After wash with phosphate buffer saline (PBS), the colonies were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) for 30 min, and then stained with 0.05% crystal violet for 15 min, as described in [23]. After extensive wash with water, the number of colonies was estimated by measuring the amount of dye (absorbance at 570 nm) released from the cells after treatment with methanol.

RNA interference

A synthetic small-interfering RNA (siRNA) duplex corresponding to the sequence of the Nrp-1 mRNA (NM_003873) 5'-GGUCCUGAAUGUCCCCAGA-3' (siNrp-1) was designed by Sigma-Aldrich. A control siRNA duplex (MISSION®, Sigma-Aldrich) was used as negative control (siCtrl). For silencing experiments, cells were plated at 2×10^5 cells per well (2.5 mL) in DMEM supplemented with 1% FCS and then transfected with siRNA (150 pmoles per well) using Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher), according to the manufacturer's recommendations.

RNA isolation and real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from 2×10^5 cells using the NucleoSpin RNA II kit (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 HS3ST3B and Nrp-1 were described in [43] and [48], respectively. They were checked for their specificity by semi-quantitative RT-PCR on a 2.5% (w/v) agarose gel. They 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), as described in [49]. 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. The average Ct of triplicate samples was used for analysis.

Immunofluorescence staining and analysis

Microscopy experiments were performed essentially as described in [30]. For the detection of HS3ST3B, cells were seeded on glass coverslips, washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min. They were then permeabilized with 0.1% saponin in PBS, treated with a blocking solution containing 0.2% gelatin, 2% BSA and 2% FCS in PBS and incubated with the anti-HS3ST3B antibody (1:100) in the blocking buffer for 1 h. After washing, cells were incubated for 1 h with Alexa 568-conjugated secondary antibodies (1:600) in blocking buffer. For the detection of 3-O-sulfated HS, recombinant HSV-1 gD (10 µg/mL)

was first incubated with anti-HSV-1 gD antibody (1:100) in blocking buffer for 30 min at 4°C. The complex was then incubated with the cells for 30 min at room temperature. After washing, cells were fixed and incubated with Alexa 488-conjugated secondary antibody, as above. In all experiments, cells were stained with 500 ng/mL DAPI (Sigma-Aldrich) for 10 min, in order to visualize cell nuclei. Immunofluorescence was analyzed with an inverted Zeiss LSM 780 microscope (Oberkochen, Germany) equipped with a 63 × oil immersion lens. Data were collected using the Zeiss Zen Pro 2.1 software and processed with Image J software.

SDS-PAGE and Western blot

Cells (4×10^5 per point) were lysed in 150 μ L of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, pH 8.0) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France) for 3 h at 4°C. Lysates were then clarified by centrifugation and protein content of the supernatants was estimated using micro-BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific). Samples corresponding to 20 μ g of proteins were mixed with Laemmli buffer and boiled for 10 min, after which proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose (Amersham, Uppsala, Sweden). The membrane was blocked for 1 h in 20 mM Tris buffer (TBS) with 0.05% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) BSA (Roche), and then probed with primary antibodies overnight at 4°C in TBS supplemented with 3% (w/v) BSA. After washing, HRP-conjugated secondary antibodies (1: 10,000) were added for 1 h and immunoreactive proteins were detected using ECL prime Western blotting detection (GE Healthcare). Quantification of immunostaining intensity was performed by using Image J software.

Statistical analysis

Results are representative of at least three independent experiments conducted with separate cellular preparations. All values are expressed as the means \pm SD. Statistical significance between the different values was analyzed by using one-way ANOVA and two-tailed Student's t-tests, with a threshold of $P < 0.05$ considered as significant.

Author Contributions: conceptualization, C.H. and F.A.; methodology, C.H., A.D. and F.A.; software, C.H., A.D. and F.A.; validation, A.D. and F.A.; formal analysis, C.H., M.D., M.C. and A.D.; investigation, C.H., M.D., M.C. and A.D.; resources, F.A.; data curation, C.H., A.D. and F.A.; writing—original draft preparation, C.H. and F.A.; writing—review and editing, A.D. and F.A.; visualization, C.H., A.D. and F.A.; supervision, A.D. and F.A.; project administration, F.A.; funding acquisition, C.H. and F.A.

Funding: This study was funded by the University of Lille, France, and by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Acknowledgments: Authors would like to thank François Foulquier for his assistance in microscopy experiments and Kenji Uchimura for critical reading of the manuscript. This study was conducted in the framework of the GDR GAG (GDR 3739).

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

References

1. Esko, J.D.; Selleck, S.B. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulphate. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 435-471, DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135458.
1. Zhang, L. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2010**, *93*, 1-17, DOI: 10.1016/S1877-1173(10)93001-9.
2. Turnbull, J.; Powell, A.; Guimond, S. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 75-82.
3. Thacker, B.E.; Xu, D.; Lawrence, R.; Esko, J.D. Heparan sulfate 3-*O*-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol.* **2014**, *35*, 60-72, DOI: 10.1016/j.matbio.2013.12.001.
4. Liu, J.; Shworak, N.W.; Fritze, L.M.; Edelberg, J.M.; Rosenberg, R.D. Purification of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27072-27082.
5. Zhang, L.J.; Lawrence, R.; Schwartz, J.J.; Bai, X.M.; Wei, G.; Esko, J.D.; Rosenberg, R.D. The effect of precursor structures on the action of glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-1 and the biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28806-28813, DOI: 10.1074/jbc.M100204200.
6. Mochizuki, H.; Yoshida, K.; Gotoh, M.; Sugioka, S.; Kikuchi, N.; Kwon, Y.D.; Tawada, A.; Maeyama, K.; Inaba, N.; Hiruma, T.; et al, H. Characterization of a heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase-5, an enzyme synthesizing a tetrasulfated disaccharide. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 26780-26787, DOI: 10.1074/jbc.M801586200.
7. Xia, G.; Chen, J.; Tiwari, V.; Ju, W.; Li, J.P.; Malmstrom, A.; Shukla, D.; Liu, J. 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.* **2002**, *277*, 37912-37919, DOI: 10.1074/jbc.M204209200.
8. Liu, J.; Shriver, Z.; Blaiklock, P.; Yoshida, K.; Sasisekharan, R.; Rosenberg, R.D. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 38155-38162.

9. O'Donnell, C.D.; Tiwari, V.; Oh, M.J.; Shukla, D. A role for heparan sulfate 3-O sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread. *Virology* **2006**, *346*, 452-459, DOI: 10.1016/j.virol.2005.11.003.
10. Shukla, D.; Liu, J.; Blaiklock, P.; Shworak, N.W.; Bai, X.M.; Esko, J.D.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Rosenberg, R.D.; Spear, P.G. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **1999**, *99*, 13-22.
11. Shworak, N.W.; Liu, J.A.; Petros, L.M.; Zhang, L.J.; Kobayashi, M.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Rosenberg, R.D. 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.* **1999**, *274*, 5170-5184.
12. Tiwari, V.; O'Donnell, C.D.; Oh, M.J.; Valyi-Nagy, T.; Shukla, D. A role for 3-O sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 930-937, DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.10.056.
13. Xu, D.; Tiwari, V.; Xia, G.; Clement, C.; Shukla, D.; Liu, J. Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem. J.* **2005**, *385*, 451-459, DOI: 10.1042/BJ20040908.
14. Bui, C.; Ouzzine, M.; Talhaoui, I.; Sharp, S.; Prydz, K.; Coughtrie, M.W.; Fournel-Gigleux, S. Epigenetics: methylation-associated repression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase gene expression contributes to the invasive phenotype of H-EMCSS chondrosarcoma cells. *Faseb J.* **2010**, *24*, 436-450, DOI: 10.1096/fj.09-136291.
15. Hwang, J.A.; Kim, Y.; Hong, S.H.; Lee, J.; Cho, Y.G.; Han, J.Y.; Kim, Y.H.; Han, J.; Shim, Y.M.; Lee, Y.S.; et al. Epigenetic inactivation of heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2 in lung cancer and its role in tumorigenesis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79634, DOI: 10.1371/journal.pone.0079634.
16. Mao, X.; Gauche, C.; Coughtrie, M.W.; Bui, C.; Gulberti, S.; Merhi-Soussi, F.; Ramalanjaona, N.; Bertin-Jung, I.; Diot, A.; Dumas, D.; et al. The heparan sulfate sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A) is a novel tumor regulator and a prognostic marker in breast cancer. *Oncogene* **2016**, *35*, 5043-5055, DOI: 10.1038/onc.2016.44.
17. Miyamoto, K.; Asada, K.; Fukutomi, T.; Okochi, E.; Yagi, Y.; Hasegawa, T.; Asahara, T.; Sugimura, T.; Ushijima, T. Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* **2003**, *22*, 274-280, DOI: 10.1038/sj.onc.1206146.
18. 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.; et al. HS3ST2 modulates breast cancer cell invasiveness *via* MAP kinase- and Tcf4 (Tcf712)-dependent regulation

- of protease and cadherin expression. *Int. J. Cancer* **2014**, *135*, 2579-2592, DOI: 10.1002/ijc.28921.
19. Song, K.; Li, Q.; Jiang, Z.Z.; Guo, C.W.; Li, P. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O sulfotransferase-3B1, a novel epithelial-mesenchymal transition inducer in pancreatic cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *12*, 388-398.
 20. Zhang, L.; Song, K.; Zhou, L.; Xie, Z.; Zhou, P.; Zhao, Y.; Han, Y.; Xu, X.; Li, P. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3B1 (HS3ST3B1) promotes angiogenesis and proliferation by induction of VEGF in acute myeloid leukemia cells. *J. Cell Biochem.* **2015**, *116*, 1101-1112, DOI: 10.1002/jcb.25066.
 21. Biroccio, A.; Cherfils-Vicini, J.; Augereau, A.; Pinte, S.; Bauwens, S.; Ye, J.; Simonet, T.; Horard, B.; Jamet, K.; Cervera, L.; et al. TRF2 inhibits a cell-extrinsic pathway through which natural killer cells eliminate cancer cells. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 818-828, DOI: 10.1038/ncb2774.
 22. Hellec, C.; Delos, M.; Carpentier, M.; Denys, A.; Allain, F. The heparan sulfate 3-O-sulfotransferases (HS3ST) 2, 3B and 4 enhance proliferation and survival in breast cancer MDA-MB-231 cells. *PLoS One* **2018**, *13*, e0194676, DOI: 10.1371/journal.pone.0194676.
 23. Thacker, B.E.; Seamen, E.; Lawrence, R.; Parker, M.W.; Xu, Y.; Liu, J.; Vander Kooij, C.W.; Esko, J.D. Expanding the 3-O-sulfate proteome - Enhanced binding of neuropilin-1 to 3-O-sulfated heparan sulfate modulates its activity. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 971-980, DOI: 10.1021/acscchembio.5b00897.
 24. Lichtenberger, B.M.; Tan, P.K.; Niederleithner, H.; Ferrara, N.; Petzelbauer, P.; Sibilio, M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* **2010**, *140*, 268-279, DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.046.
 25. Prud'homme, G.J.; Glinka, Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* **2012**, *3*, 921-939.
 26. Raimondi, C.; Ruhrberg, C. Neuropilin signalling in vessels, neurons and tumours. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2013**, *24*, 172-178, DOI: 10.1016/j.semcdb.2013.01.001.
 27. Uniewicz, K.A.; Fernig, D.G. Neuropilins: a versatile partner of extracellular molecules that regulate development and disease. *Front Biosci.* **2008**, *13*, 4339-4360.
 28. West, D.C.; Rees, C.G.; Duchesne, L.; Patey, S.J.; Terry, C.J.; Turnbull, J.E.; Delehedde, M.; Heegaard, C.W.; Allain, F.; Vanpouille, C.; et al. Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13457-13464, DOI: 10.1074/jbc.M410924200.

29. Delos, M.; Foulquier, F.; Hellec, C.; Vicogne, D.; Fifre, A.; Carpentier, M.; Papy-Garcia, D.; Allain, F.; Denys, A. Heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase 2 (HS3ST2) displays an unexpected subcellular localization in the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **2018**, *1862*, 1644-1655, DOI: 10.1016/j.bbagen.2018.04.013.
30. Debatin, K.M.; Krammer, P.H. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* **2004**, *23*, 2950-2966, DOI: 10.1038/sj.onc.1207558.
31. Mitsiades, C.S.; Mitsiades, N.; Koutsilieris, M. The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr. Cancer Drug Targets* **2004**, *4*, 235-256.
32. Sánchez-Bailón, M.P.; Calcabrini, A.; Gómez-Domínguez, D.; Morte, B.; Martín-Forero, E.; Gómez-López, G.; Molinari, A.; Wagner, K.U.; Martín-Pérez, J. Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Signal.* **2012**, *6*, 1276-1286.
33. Fuh, G.; Garcia, K.C.; de Vos, A.M. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26690-26695, DOI: 10.1074/jbc.M003955200.
34. Teran, M.; Nugent, M.A. Synergistic binding of vascular endothelial growth factor-A and its receptors to heparin selectively modulates complex affinity. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 16451-16462. DOI: 10.1074/jbc.M114.627372.
35. Bachelder, R.E.; Crago, A.; Chung, J.; Wendt, MA.; Shaw, L.M.; Robinson, G.; Mercurio, A.M. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5736-5740.
36. Miao, H.Q.; Lee, P.; Lin, H.; Soker, S.; Klagsbrun, M. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J.* **2000**, *14*, 2532-2539, DOI: 10.1096/fj.00-0250com
37. Rizzolio, S.; Rabinowicz, N.; Rainero, E.; Lanzetti, L.; Serini, G.; Norman, J.; Neufeld, G.; Tamagnone, L. Neuropilin-1-dependent regulation of EGF-receptor signaling. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5801-5811, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0995.
38. Sarabipour, S.; Mac Gabhann, F. VEGF-A121a binding to neuropilins - A concept revisited. *Cell Adh. Migr.* **2018**, *12*, 204-214, DOI: 10.1080/19336918.2017.1372878.
39. Mochizuki, H.; Yoshida, K.; Shibata, Y.; Kimata, K. Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate: enzymatic formation and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 31237-31245, DOI: 10.1074/jbc.M801586200.
40. Wang, Z.; Hsieh, P.H.; Xu, Y.; Thieker, D.; Chai E.J., Xie, S.; Cooley, B.; Woods, R.J.; Chi, L.; Liu, J. Synthesis of 3-*O*-sulfated oligosaccharides to understand the relationship between structures and functions of heparan sulfate. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5249-5256, DOI: 10.1021/jacs.7b01923.

41. Krenn, E.C.; Wille, I.; Gesslbauer, B.; Poteser, M.; van Kuppevelt, T.H.; Kungl, A.J. Glycanogenomics: a qPCR-approach to investigate biological glycan function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *375*, 297-302, DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.07.144.
42. Martinez, P.; Denys, A.; Delos, M.; Sikora, A.S.; Carpentier, M.; Julien, S.; Pestel, J.; Allain, F. Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* **2015**, *25*, 502-513, DOI: 10.1093/glycob/cwu137.
43. Sikora, A.S.; Delos, M.; Martinez, P.; Carpentier, M.; Allain, F.; Denys, A. Regulation of the expression of heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by inflammatory stimuli in human monocytes. *J. Cell. Biochem.* **2016**, *117*, 1529-1542, DOI: 10.1002/jcb.25444.
44. Sikora, A.S.; Hellec, C.; Carpentier, M.; Martinez, P.; Delos, M.; Denys, A.; Allain, F. Tumour-necrosis factor- α induces heparan sulfate 6-*O*-endosulfatase 1 (Sulf-1) expression in fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2016**, *80*, 57-65, DOI: 10.1016/j.biocel.2016.09.021.
45. Dunn, G.P.; Bruce, A.T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 991-998, DOI: 10.1038/ni1102-991.
46. Zhang, Z.; Jiang, H.; Wang, Y.; Shi, M. Heparan sulfate D-glucosamine 3-*O*-sulfotransferase 3B1 is a novel regulator of transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and regulated by miR-218 in non-small cell lung cancer. *J. Can. Res. Ther.* **2018**, *14*, 24-29, doi: 10.4103/jcrt.JCRT_659_17.
47. Aung, N.Y.; Ohe, R.; Meng, H.; Kabasawa, T.; Yang, S.; Kato, T.; Yamakawa, M. Specific neuropilins expression in alveolar macrophages among tissue-specific macrophages. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147358, DOI: 10.1371/journal.pone.0147358.
48. Delos, M.; Hellec, C.; Foulquier, F.; Carpentier, M.; Allain, F.; 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. *FEBS Open Bio* **2016**, *7*, 133-148, DOI: 10.1002/2211-5463.12145

II. Résultats complémentaires

Les modifications des réponses de cellules cancéreuses telles que celles induites par la surexpression des HS3STs peuvent s'accompagner de changements de la morphologie cellulaire. Nous avons donc observé en microscopie optique les cellules exprimant stablement HS3ST3B par coloration au crystal violet. Par rapport aux cellules MDA-MB-231 parentales, les cellules des clones C et D apparaissent plus larges, plus étalées et plus allongées. Afin de vérifier cette observation, nous avons calculé le facteur d'élongation des cellules cultivées en condition de non confluence. Il apparaît que les cellules surexprimant HS3ST3B sont environ deux fois plus grandes que les cellules contrôles (Figure 38A). Pour confirmer ce résultat, nous avons analysé la morphologie des cellules en microscopie à contraste interférentiel différentiel qui a l'avantage de montrer le relief des objets observés (méthode DIC). Les cellules issues des clones C et D apparaissent beaucoup plus grandes et fines que les cellules contrôles, avec un noyau et un cytoplasme très aplatis, ce qui est probablement lié à leur étalement sur le support (Figure 38B).

L'augmentation du facteur d'élongation a été décrite comme étant une caractéristique des cellules invasives (Ren *et al.*, 2015). De plus, nous avons observé que la surexpression de HS3ST3B conduisait à une forte activation de c-Src. Or, la suractivation de la kinase c-Src est fréquemment observée chez les cellules invasives et conduit à l'augmentation de l'expression et de la phosphorylation de la cortactine qui est un marqueur d'invadopode (Schnoor *et al.*, 2018). Nous avons donc analysé l'activation de cette voie associée à l'invasion dans notre modèle cellulaire. Chez les cellules qui surexpriment stablement HS3ST3B, nous avons observé que l'expression de la cortactine est significativement augmentée d'une part (Figure 39A), et que la quantité de sa forme phosphorylée est nettement plus importante d'autre part (Figure 39B). Ces résultats montrent que la présence de HS3ST3B favorise l'expression de la cortactine ainsi que sa phosphorylation.

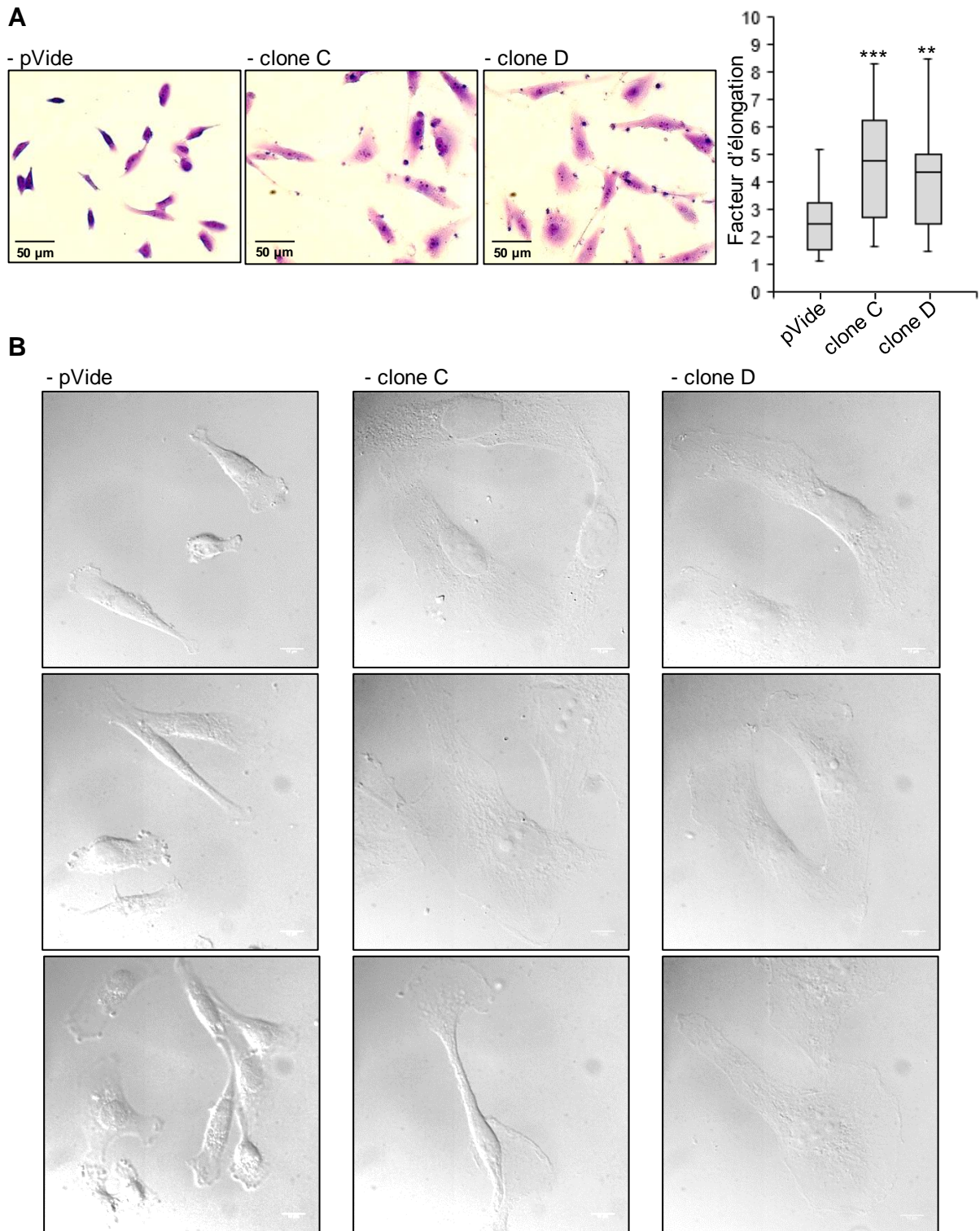


Figure 38 : Effet de la surexpression stable de HS3ST3B sur la morphologie des cellules MDA-MB-231. (A) Après fixation et coloration au crystal violet, les facteurs d'élongation (ratios longueur/largeur) des cellules contrôles et des clones C et D ont été calculés à l'aide du logiciel Image J (N= 30 cellules par analyse ; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, significativement différent par rapport aux cellules contrôles) **(B)**. La morphologie des cellules a été confirmée par analyse en microscopie DIC (représentatif de 30 clichés par conditions).

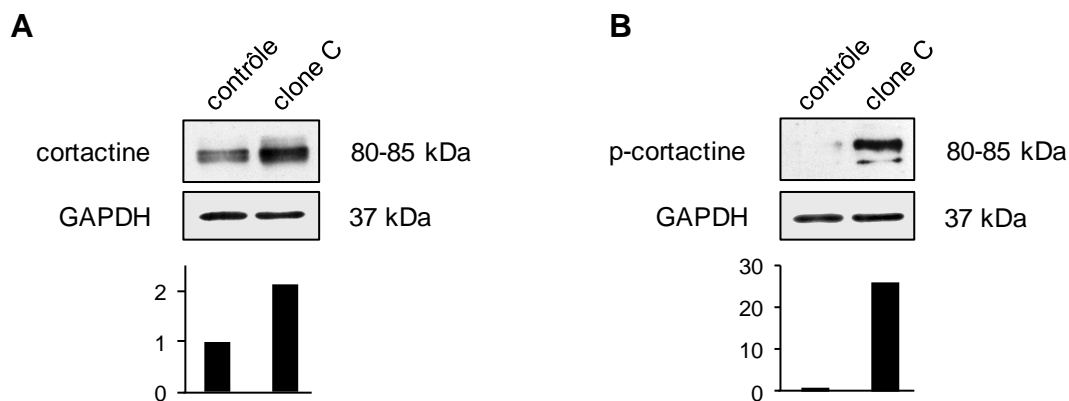


Figure 39 : Analyse de l'activation de la cortactine lors de la surexpression de HS3ST3B. Après 24 h de culture, les cellules ont été mises dans un milieu dépourvu en SVF pendant 2 h avant d'être récoltées puis lysées. Les protéines ont alors été séparées en SDS-PAGE puis détectées en Western Blot avec des anticorps dirigés contre les formes totales (**A**) ou phosphorylées (**B**) de la cortactine. Des immunoblots réalisés en parallèle ont permis la détection de la GAPDH, confirmant le chargement équivalent des échantillons. Les histogrammes représentent la quantification des formes totales ou phosphorylées de la cortactine par rapport à la GAPDH. Les données ont été normalisées par rapport aux cellules contrôles. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Finalement, nous avons voulu comprendre si ces effets pouvaient être reliés à une augmentation maintenue de l'activation d'un récepteur aux facteurs de croissance. L'activation de la voie c-Src/cortactine est notamment décrite à la suite d'une augmentation de l'activation de l'EGFR (Meirson *et al.*, 2018a). De plus, la Nrp-1 est connue pour interagir avec l'EGFR (Shi *et al.*, 2018). Nous avons donc analysé l'expression et la phosphorylation de EGFR dans nos modèles cellulaires après une stimulation avec de l'EGF recombinant en l'absence de sérum de veau fœtal.

Etonnamment, nous avons observé que les niveaux d'expression du récepteur de l'EGF sont plus élevés lorsque les cellules surexpriment stablement HS3ST3B (Figure 40). De plus, même si dans les deux cas, les quantités d'EGFR diminuent au cours du temps, cette diminution est plus rapide chez les cellules contrôles. Contrairement à ces dernières, les cellules exprimant HS3ST3B présentent également des quantités globalement plus importantes de la forme phosphorylée de EGFR, et ceci dès 10 min de stimulation. En effet, la quantité maximale de phospho-EGFR n'est atteinte qu'au bout de 1 h de stimulation chez les cellules contrôles. Les quantités de p-EGFR ne sont atténuées que 4 h après la stimulation lorsque HS3ST3B est surexprimée tandis qu'elles diminuent dans les 2 h suivant la stimulation chez les cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que la surexpression de HS3ST3B est associée à une augmentation de l'expression de l'EGFR, ce qui pourrait augmenter la sensibilité des cellules à une stimulation à l'EGF et favoriser le maintien de la signalisation associée.

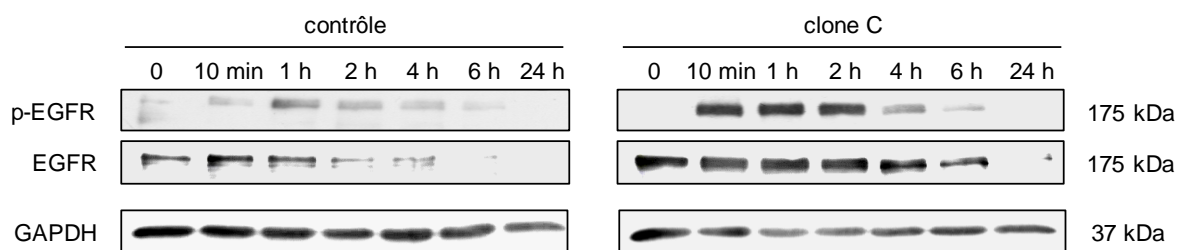


Figure 40 : Effet de la stimulation par l'EGF sur la phosphorylation de EGFR. Après 24 h de culture, les cellules ont été mises dans un milieu dépourvu en SVF pendant 12 h. Les cellules ont alors été stimulées avec de l'EGF (10 ng/mL), puis lysées aux temps indiqués. Les protéines ont été séparées en SDS-PAGE puis détectée en Western Blot avec des anticorps dirigés contre p-EGFR. Des immunoblots réalisés en parallèle ont permis la détection de la forme totale de l'EGFR et de la GAPDH pour s'assure du chargement équivalent des pistes.

III. Discussion

En conditions physiologiques, la Nrp-1 est exprimée dans de nombreux types cellulaires, dont les cellules endothéliales, les neurones, et certaines sous-populations leucocytaires. Elle est capable d'interagir avec un grand nombre de ligands tels que la Sema3A et différents facteurs de croissance (West *et al.*, 2008 ; Uniewicz *et al.*, 2008 ; Prud'homme & Glinka, 2012 ; Raimondi *et al.*, 2013). Plusieurs études montrent qu'elle peut être impliquée dans la croissance des cellules cancéreuses *via* ses interactions avec le VEGF, l'EGF, le PDGF, l'HGF ou le TGF- β . De plus, son expression est augmentée dans différents types de cancer et est associée à un mauvais pronostic (Guttmann-Raviv *et al.*, 2006 ; Prud'homme & Glinka, 2012 ; Chaudhary *et al.*, 2014). Par ailleurs, il a récemment été démontré que la Nrp-1 interagissait spécifiquement avec les HS 3-*O*-sulfatés d'une part, et que la 3-*O*-sulfatation favorisait ses fonctions d'autre part (Thacker *et al.*, 2016).

Nous avons donc envisagé la possibilité que la 3-*O*-sulfatation des HS membranaires favorise les interactions entre la Nrp-1 et certains facteurs de croissance pour augmenter la progression tumorale. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré des cellules qui surexpriment stablement HS3ST3B. Dans un premier temps, nous nous sommes assuré que l'expression de l'enzyme était bien associée à la présence d'HS 3-*O*-sulfatés à la surface cellulaire. L'interaction d'une forme soluble de la protéine gD étant supérieure avec les cellules MDA-MB-231 transfectés stablement, nous avons confirmé la présence de motifs 3-*O*-sulfatés à la membrane plasmique. Les cellules surexprimant stablement HS3ST3B présentent également une prolifération et une survie augmentées par rapport aux cellules contrôles, reproduisant le phénotype observé lors des surexpressions transitoires des HS3ST2, 3B et 4 en cellules MDA-MB-231. En complément, nous avons observé que la surexpression stable de HS3ST3B entraînait une augmentation de l'activation de Akt et de c-Src maintenue dans le temps. Ces effets ont été observés lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu dépourvu en sérum, suggérant la mise en place d'un mécanisme autocrine d'activation cellulaire. Les

mêmes expériences ont été reproduites avec des cellules dont l'expression de la Nrp-1 a été invalidée par ARN interférence. Nous avons observé que l'invalidation d'expression de la Nrp-1 diminuait fortement la prolifération et la viabilité des cellules exprimant HS3ST3B tandis que l'effet est plus modéré chez les cellules contrôles. La perte de l'expression de la Nrp-1 entraîne également une diminution importante de la survie cellulaire lorsque les cellules sont exposées à des stimuli pro-apoptotiques. De plus, l'invalidation de la Nrp-1 chez les cellules issues des clones exprimant HS3ST3B entraîne une diminution de l'activation de Akt et de c-Src, la ramenant à un niveau similaire à celui observé chez les cellules contrôles. Ces résultats montrent donc que l'absence de la Nrp-1 supprime l'avantage apporté aux cellules par l'expression de HS3ST3B. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les effets pro-tumoraux induits par la surexpression de HS3ST3B pourraient dépendre de l'implication de la Nrp-1 dans la formation de complexes de signalisation.

Par ailleurs, des perturbations de la signalisation cellulaire telles que celles provoquées par la surexpression de HS3ST3B peuvent induire des modifications de la morphologie des cellules. Nous avons en effet observé que la forme des cellules exprimant stablement HS3ST3B différait de manière étonnante de celle des cellules contrôles. Lorsque l'enzyme est surexprimée, les cellules sont environ 2 fois plus larges et aplaties. Elles sont également très allongées, ce qui est caractéristique de cellules invasives (Ren *et al.*, 2015). De manière intéressante, il a déjà été observé que la surexpression transitoire de HS3ST3B entraînait une modification de la forme des cellules, lesquelles devenaient alors plus allongées et acquéraient un phénotype caractéristique de cellules invasives (Song *et al.*, 2011).

De plus, nous avons observé que l'expression de la cortactine est augmentée significativement dans les cellules surexprimant stablement HS3ST3B, qui présentent également une augmentation importante de sa forme phosphorylée. La cortactine phosphorylée, par les interactions qu'elle établit avec les filaments d'actine, participe activement à la formation des invadopodes et augmente les capacités invasives des cellules (Yin *et al.*, 2017 ; Genna *et al.*, 2018). L'invalidation de son expression supprime la formation des invadopodes (Li *et al.*, 2018). La cortactine est d'ailleurs considérée comme un marqueur de ces structures et son expression est fréquemment augmentée chez les cellules cancéreuses invasives (Yin *et al.*, 2016 ; Schnoor *et al.*, 2018). Dans leur étude, Song *et al.* (2011) ont observé que la surexpression transitoire de HS3ST3B conduisait à une augmentation des capacités invasives des cellules. De plus, leurs résultats montraient un changement de l'organisation des filaments d'actine lorsque HS3ST3B était surexprimée. Toutefois, leurs données n'ont pas été reliées à l'activation de la cortactine. Des travaux supplémentaires seront donc nécessaires pour vérifier le lien entre la surexpression de HS3ST3B, l'expression de la cortactine et des capacités invasives accrues. Il pourrait être intéressant d'examiner la

localisation subcellulaire de la cortactine et de sa forme phosphorylée afin de déterminer si elles sont réparties en clusters à proximité de la membrane plasmique. De plus, il a été montré que la cortactine colocalisait avec le complexe de nucléation des filaments d'actine Arp2/3 pour induire la formation des invadopodes, mais aussi avec Arg, une protéine de la famille Abl, et Tks5, ces deux protéines participant à l'invasion cellulaire (Mader *et al.*, 2011 ; Sharma *et al.*, 2011 ; Meirson *et al.*, 2018b). Il serait donc nécessaire de vérifier la colocalisation de la cortactine avec ces protéines dans notre modèle cellulaire. Des tests cellulaires d'invasion à travers une matrice devront également être envisagés pour confirmer le changement de comportement cellulaire.

Finalement, nous avons voulu vérifier si, en accord avec les résultats obtenus pour c-Src, une stimulation à l'EGF entraînait une augmentation maintenue de l'activation de son récepteur. Les résultats obtenus montrent que lorsque HS3ST3B est surexprimée, les quantités de EGFR sont plus importantes et diminuent moins rapidement en l'absence de sérum ce qui suggère que les mécanismes de dégradation sont partiellement inhibés. De manière intéressante, il a été montré qu'une augmentation de l'expression de la cortactine pouvait réduire la dégradation de l'EGFR, suggérant alors l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif (Zhang *et al.*, 2017). Ce modèle pourrait expliquer les résultats que nous avons observés. Des expériences d'inactivation d'expression de la cortactine seront nécessaires pour le confirmer. De plus, les quantités de la forme phosphorylée de EGFR sont plus importantes chez les cellules exprimant HS3ST3B et sont maintenues dans le temps par rapport aux cellules contrôles, ce qui donne à penser que l'expression de l'enzyme favorise la stabilisation des complexes ligands/récepteur. La Nrp-1 étant connue pour interagir avec l'EGFR (Shi *et al.*, 2018), il est possible qu'elle participe au maintien des complexes EGF/EGFR lorsque HS3ST3B est surexprimée. Des expériences supplémentaires d'inactivation de la Nrp-1 seront nécessaires pour le confirmer. Il est en outre connu que la kinase c-Src, après activation par l'EGFR notamment, est capable de phosphoryler la cortactine (Mader *et al.*, 2011 ; Ramos-Garcia *et al.*, 2018). Il est donc envisageable que, dans notre modèle, l'activation prolongée de EGFR entraîne une augmentation de l'activation de c-Src qui est à l'origine de l'augmentation de l'expression et de la phosphorylation de la cortactine. Par ailleurs, c-Src étant suractivée lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu dépourvu en sérum, donc en l'absence de facteurs de croissance et sans stimulation à l'EGF, il est probable que l'augmentation de son activation soit due à un mécanisme autocrine. Néanmoins, l'implication de l'EGF est envisageable dans notre modèle puisque les cellules MDA-MB-231 en sécrètent de manière autocrine (Hayes *et al.*, 2013).

Dans leur ensemble, ces données suggèrent que les effets pro-tumoraux induits par la surexpression de HS3ST3B pourraient dépendre de la Nrp-1 et de sa capacité à interagir avec

différents facteurs de croissance. Toutefois, la manière dont les HS 3-*O*-sulfatés sont impliqués dans ces mécanismes est pour le moment inconnue. Chez les cellules endothéliales, la régulation de l'activité du VEGF a été largement étudiée et implique les HS, qui interagissent directement avec ce facteur, mais aussi avec ses récepteurs et la Nrp-1 (Sarabipour & Mac Gabhann, 2018). En ce sens, Teran & Nugent (2015) ont montré qu'un traitement au chlorate, qui inhibe la sulfatation des HS, conduit à la suppression des capacités de la Nrp-1 à intervenir dans la formation de ces complexes, suggérant une faible interaction entre le VEGF et la Nrp-1 en l'absence d'HS sulfatés. De plus, l'ajout d'héparine permet de rétablir les interactions, soutenant donc un modèle selon lequel la formation d'un complexe ternaire Nrp-1/VEGF/VEGFR de haute affinité dépend de la présence des HS. Il a alors été proposé que les HS facilitaient la formation du complexe et/ou permettait sa stabilisation.

Considérant ces données et nos résultats, il est envisageable que la 3-*O*-sulfatation des HS membranaires facilite les interactions entre la Nrp-1 et ses partenaires et favorise la stabilisation des complexes Nrp-1/facteur de croissance/récepteur. Ainsi, les augmentations maintenues de l'activation de c-Src et de Akt qui conduisent à une augmentation de la prolifération, de la survie cellulaire et de l'activation de la cortactine pourraient être dues à un mécanisme d'activation similaire à celui du VEGF. Toutefois, il reste à identifier quels sont les facteurs et récepteurs impliqués. De plus, d'autres travaux seront nécessaires pour vérifier une potentielle augmentation du caractère invasif des cellules. La cortactine pouvant être un marqueur de mauvais pronostic (Bissinger *et al.*, 2017), l'augmentation de son expression et de sa phosphorylation renforce l'idée selon laquelle HS3ST3B favorise la progression tumorale.

Conclusion générale

Les HS sont des polysaccharides retrouvés à la surface cellulaire et dans la MEC. Ils sont formés par la répétition d'un grand nombre de disaccharides qui sont eux-mêmes composés d'un acide uronique (GlcUA ou IdoUA) lié à une GlcN. Ces disaccharides peuvent subir diverses modifications lors de l'étape de maturation des HS. La fonction amine de la GlcN peut rester acétylée, être sulfatée ou plus rarement ne pas être substituée, tandis que ses fonctions hydroxyles peuvent être sulfatées en position C3 et/ou C6. Quant à l'acide uronique, il peut être sulfaté en position C2. L'ensemble de ces modifications est réalisé par quatre familles d'isoenzymes : les NDSTs, HS2ST, les HS6STs et les HS3STs. La singularité du système de biosynthèse des HS réside dans le fait que l'action de ces quatre familles d'enzymes n'est pas systématique. Chaque membre d'une même famille d'enzymes présente, en outre, une activité enzymatique ainsi qu'une spécificité de substrat qui lui est propre. Ce système est à l'origine de la micro-hétérogénéité structurale des HS : au sein d'une même chaîne, certaines régions sont très modifiées tandis que d'autres le sont peu, voire pas du tout. De surcroît, l'expression de ces enzymes dépend du type cellulaire et de l'environnement, ce qui ajoute un degré de complexité structurale supplémentaire. Les HS sont donc des molécules très hétérogènes. Ils sont ainsi capables d'interagir avec un grand nombre de médiateurs protéiques tels que des cytokines, des chimiokines, des composants de la MEC ou des facteurs de croissance, et régulent *via* ces interactions de nombreux processus physiologiques ou pathologiques.

Bien que les HS3STs soit la famille d'enzymes comptant le plus de membres, la 3-*O*-sulfatation est la modification la plus rare. En effet, il est estimé que seuls 1 à 5% des disaccharides sont 3-*O*-sulfatés. L'impact de cette modification est en outre encore incompris. Si différents travaux suggèrent que les HS3STs sont impliquées dans plusieurs processus, peu de ligands sont connus pour interagir spécifiquement avec des HS 3-*O*-sulfatés (Thacker *et al.*, 2014). Les fonctions de la 3-*O*-sulfatation dans les processus cancéreux sont d'ailleurs controversées. En effet, plusieurs travaux ont montré que les gènes codant pour les HS3STs étaient méthylés chez les cellules cancéreuses, et donc que les enzymes n'y étaient pas exprimées. La restauration de l'expression des HS3STs ou leur surexpression conduisent à une diminution de la prolifération, suggérant alors qu'elles jouent des fonctions antitumorales (Miyamoto *et al.*, 2003 ; Shivapurkar *et al.*, 2007 ; Martin-Subero *et al.*, 2009 ; Jiang *et al.*, 2009 ; Bui *et al.*, 2010 ; Hwang *et al.*, 2013 ; Mao *et al.*, 2016 ; Kassim *et al.*, 2017). A l'inverse, d'autres travaux donnent à penser que les HS3STs jouent un rôle pro-tumoral. En effet, il a été observé que la surexpression de HS3ST2 ou de HS3ST3B entraînait une augmentation de la prolifération cellulaire, alors que HS3ST4 pourrait favoriser la protection des cellules cancéreuses contre le système immunitaire (Birrocio *et al.*, 2013 ; Vijaya-Kumar *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015). Même si les fonctions de la 3-*O*-sulfatation dans le cancer ne sont toujours pas établies, il semble tout de même que les modifications d'expression des HS3STs impactent

en profondeur le comportement des cellules. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour une meilleure compréhension de leur rôle.

Dans ce contexte, la première partie de mes travaux a été consacrée à la caractérisation des modifications du phénotype cancéreux induites par la surexpression des HS3ST2, 3A, 3B et 4 dans des lignées cellulaires de cancer du sein. Pour cette étude, les enzymes ont été surexprimées de manière transitoire dans les modèles cellulaires MDA-MB-231 et BT-20. Dans un premier temps, nous avons observé que la surexpression des HS3ST2, 3B et 4 entraînait une augmentation de la prolifération et de la viabilité cellulaires. De même, nous avons observé qu'en présence de l'une de ces trois enzymes, les capacités à former des colonies sont remarquablement améliorées, traduisant alors un effet des HS3ST2, 3B et 4 sur la survie cellulaire. Étonnamment, la surexpression de HS3ST3A n'a d'effet sur aucun de ces processus. Nous avons ensuite observé que les réponses cellulaires entraînées par la surexpression des HS3ST2, 3B et 4 étaient associées à une augmentation de l'activation de Src et de Akt, deux protéines dont l'activation aberrante a fréquemment été caractérisée chez les cellules cancéreuses (Sever & Brugge, 2015). De plus, nos résultats montrent que la surexpression des HS3STs, excepté celle de HS3ST3A, est reliée à une diminution de la quantité totale de I κ B d'une part, et à une augmentation de la quantité de la forme phosphorylée de p-65 d'autre part, ce qui traduit une activation de la voie NF- κ B. Il est connu que l'activation de cette voie entraîne une augmentation de la survie cellulaire en conduisant notamment à la synthèse de protéines anti-apoptotiques (Mitsiades *et al.*, 2004 ; Sánchez-Bailón *et al.*, 2012 ; Rikenbaugh *et al.*, 2016). Nous avons logiquement observé que la surexpression des HS3STs était associée à une augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques XIAP et survivine. Nous avons alors testé la résistance des cellules, surexprimant ou non les HS3STs, à l'apoptose induite *in vitro* grâce à l'utilisation d'un mélange composé de TNF- α et d'un anticorps dirigé contre Fas pour mimer une réponse immunitaire. Nous avons ainsi montré que les cellules sont plus résistantes à l'induction de l'apoptose lorsque HS3ST2, 3B et 4 sont surexprimées. Nous avons ensuite soumis les cellules cancéreuses à l'action cytotoxique des cellules NK isolées de sang humain. De même, nous avons observé que la surexpression de chacune de ces trois enzymes permet aux cellules de résister à la lyse induite par les cellules NK. Dans leur ensemble, ces premiers résultats montrent que les HS3ST2, 3B et 4 exercent des fonctions pro-tumorales dans nos modèles cellulaires.

Dans un second temps, nous avons approfondi l'étude du mécanisme moléculaire impliqué dans la mise en place des effets associés à la surexpression des HS3ST2, 3B, et 4. Pour ce faire, nous avons généré des cellules qui expriment stablement HS3ST3B à partir de la lignée MDA-MB-231. Nous avons alors vérifié que la surexpression stable de l'enzyme conférait aux cellules les mêmes gains de fonctions que dans le cas de la surexpression

transitoire des HS3ST2, 3B, et 4, dans le but de valider notre modèle cellulaire. Comme attendu, la surexpression stable de HS3ST3B entraîne une augmentation importante de la prolifération et de la survie cellulaires. Nous avons également observé une augmentation prolongée de l'activation de c-Src et de Akt lorsque les cellules étaient placées en milieu dépourvu de facteurs de croissance, suggérant la mise en place d'un mécanisme autocrine. Une des questions principales restant en suspens concernait l'éventuelle implication d'un ligand des HS 3-*O*-sulfatés agissant comme récepteur ou co-récepteur. Des travaux récents ont montré que la Nrp-1, une protéine connue pour remplir le rôle de co-récepteur pour différents facteurs de croissance chez les cellules cancéreuses, était capable d'interagir avec les HS 3-*O*-sulfatés (Prud'homme & Glinka, 2012 ; Thacker *et al.*, 2016). Nous avons donc émis l'hypothèse que la Nrp-1 pourrait interagir avec les HS 3-*O*-sulfatés présents à la surface cellulaire pour favoriser les effets observés dans les cellules exprimant HS3ST3B. Des expériences d'inactivation d'expression de la Nrp-1 par ARN interférence ont montré que l'absence de la protéine chez les cellules exprimant HS3ST3B était associée à des diminutions significatives de la prolifération, de la viabilité et de la résistance aux traitements pro-apoptotiques des cellules, quand son absence a moins d'impact chez les cellules contrôles. De même, l'absence de la Nrp-1 entraîne une diminution importante des quantités des formes phosphorylées de Src et de Akt, qui sont alors comparables à celles retrouvées chez les cellules contrôles. Ces résultats suggèrent donc que la Nrp-1 est impliquée dans la signalisation induite par la surexpression des HS3STs.

Finalement, nous avons examiné l'impact de la surexpression stable de HS3ST3B sur la forme des cellules. En effet, la surexpression de l'enzyme modifie en profondeur le comportement cellulaire, et de tels changements peuvent être accompagnés de changements morphologiques. Nous avons alors observé que les cellules exprimant stablement HS3ST3B étaient plus fines et plus allongées, ce qui est caractéristique des cellules invasives (Ren *et al.*, 2015). Nous avons donc examiné l'activation d'une voie impliquée dans l'invasion cellulaire. Chez les cellules qui surexpriment HS3ST3B, les niveaux d'expression de la cortactine et les quantités de sa forme phosphorylée sont augmentées, suggérant son activation. Il est décrit que la cortactine est activée par c-Src lorsque le récepteur à l'EGF est activé (Mader *et al.*, 2011 ; Ramos-Garcia *et al.*, 2018). Nous avons alors examiné le devenir de EGFR après une stimulation à l'EGF. De manière surprenante, nous avons observé une augmentation de l'expression de ce récepteur chez les cellules qui expriment stablement HS3ST3B. Nous avons aussi observé que son activation était maintenue, à l'image de celle observée pour c-Src. Toutefois, les augmentations de l'activation de la cortactine et de Src ayant été observées en l'absence de facteur de croissance, il n'est pas possible de conclure quant à un mécanisme dépendant de l'EGF dans notre modèle, bien qu'il serait envisageable étant donné qu'une telle

boucle de signalisation autocrine ait déjà été décrit dans les mécanismes d'invasion des cellules MDA-MB-231 (Hayes *et al.*, 2012). Dans leur ensemble, ces derniers résultats suggèrent que la surexpression de HS3ST3B pourrait également entraîner une augmentation du comportement invasif des cellules. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Un des objectifs de notre étude était de mettre en lumière l'existence d'éventuelles différences dans les réponses induites par la surexpression des HS3STs. Sur la base d'homologies de séquence dans leur domaine sulfotransférase, les HS3STs sont séparées en deux groupes. Ainsi, les HS3ST1 et 5 sont regroupées sous le terme HS3STs de « type AT », car elles sont responsables de la synthèse du motif de fixation de l'antithrombine III. Les HS3ST2, 3A, 3B, 4, 5 et 6 sont impliquées dans la synthèse du motif de fixation de la protéine gD du virus HSV-1, et ont alors été regroupées sous la dénomination HS3STs de « type gD ». Ces différences s'expliquent par le fait que les HS3STs de type AT et de type gD ne reconnaissent pas les mêmes substrats (Thacker *et al.*, 2014). Toutefois, certaines HS3STs de type gD peuvent synthétiser des HS anticoagulants, bien que ces derniers soient moins efficaces, fragilisant alors l'idée de l'existence de différences fonctionnelles entre les deux sous-groupes de HS3STs. En effet, la surexpression des HS3ST2 et 3A conduit à la synthèse d'HS pouvant se lier à l'AT-III, mais dont les fonctions anticoagulantes sont environ 300 fois moins importantes que celles des HS produits suite à la surexpression de HS3ST1 (Liu *et al.*, 1999 ; Yabe *et al.*, 2001). En fait, il est probable qu'il existe plusieurs séquences de liaisons à l'AT-III, et que celles résultant de l'action des HS3ST2 et 3A présentent moins d'affinité pour l'AT-III que celles résultant de l'action de HS3ST1. Ceci suggère tout de même que les HS3ST2 et 3A ne reconnaissent pas les mêmes substrats que HS3ST1, les premières présentant une spécificité de substrat moins stricte. Il a également été observé que HS3ST3 pouvait générer *in vitro* des HS capables de se lier à l'AT-III (Wang *et al.*, 2017). En revanche, la surexpression de HS3ST1 en cellules CHO ou COS-7 ne permet pas leur infection par le virus HSV-1 (Shukla *et al.*, 1999 ; Yabe *et al.*, 2001). Cette dernière observation conforte la classification des HS3STs en deux sous-groupes distincts, même si la distinction n'est basée que sur les interactions avec l'AT-III ou la protéine HSV-1 gD.

Des données récentes suggèrent toutefois que la différence d'activité de ces familles d'enzymes ne serait pas limitée à ces deux ligands. En effet, il a été montré que les fonctions de développement neuronal associées à la Nrp-1 étaient fortement diminuées après invalidation d'expression de HS3ST2, quand l'invalidation de l'expression de HS3ST1 restait sans effet (Thacker *et al.*, 2016). Selon cette étude, il est envisageable que les fonctions de la Nrp-1 dépendent uniquement des HS3STs de type gD, et non de celles de type AT. Comme nous avons montré que la Nrp-1 intervient dans le mécanisme induisant les effets associés à

une HS3ST de type gD chez les cellules cancéreuses, il est probable que les HS3STs de type AT n'aient pas les mêmes effets sur les cellules cancéreuses que celles de type gD. Ainsi, seules les HS3STs de type gD pourraient vraisemblablement favoriser la progression tumorale de cette manière. En ce sens, il a été montré que la surexpression de HS3ST1 chez une lignée cellulaire de chondrosarcome n'avait pas d'effet sur la prolifération (Bui *et al.*, 2010). Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour confirmer les différences fonctionnelles entre les deux sous-groupes de HS3STs dans le cancer.

Par ailleurs, si les séquences protéiques et les distributions tissulaires des différentes HS3STs de type gD ont été largement étudiées, aucune différence fonctionnelle entre ces enzymes n'a été clairement établie à ce jour. Nos travaux montrent que la surexpression de HS3ST2, 3B et 4 favorisent l'activation de voies de signalisation conduisant à une augmentation de la survie cellulaire, tandis que celle de HS3ST3A n'a pas d'effet sur ces processus. De manière intéressante, il a été montré que l'inactivation de l'expression de HS3STA dans les entérocytes de drosophile conduisait à une augmentation de l'apoptose, renforçant l'hypothèse selon laquelle certaines HS3STs pourraient être des facteurs de survie (Guo *et al.*, 2014b). De même, il a précédemment été observé que l'expression endogène de HS3ST2 chez les macrophages M2 était nécessaire à la fixation de la CyPB et de la protéine gD, ce qui a induit l'activation des voies de survie cellulaire *via* le récepteur HVEM (Delos *et al.*, 2016). Ainsi, ces données suggèrent que les HS3ST2, 3B et 4 favorisent la survie cellulaire, à la différence de HS3ST3A, ce qui donne à penser qu'il existe des différences fonctionnelles entre les HS3STs de type gD.

Cela étant, il convient de nuancer ces propos dans le cas du cancer du sein. Les cellules tumorales mammaires peuvent en effet être classées en différents sous types moléculaires en fonction de l'expression du récepteur aux œstrogènes (ER), du récepteur à la progestérone (PR) et d'un des récepteurs à l'EGF (HER2). Ainsi, on distingue les cellules de type *luminal A* (ER+, HER2-), les cellules de type *luminal B* (ER+, HER2+), les cellules *HER2-enriched* (HER2+, ER-) et les cellules de *basal-like* triple négatifs (ER-, PR-, HER2-) (Prat & Perou, 2011). Étonnamment, il a été montré que les effets induits par la surexpression de HS3ST3A dépendaient de l'expression de HER2. Ainsi, chez les cellules triples négatives ou de type *luminal A*, l'enzyme pourrait agir comme un suppresseur de tumeur tandis qu'elle favoriserait la croissance et la survie des cellules de type *luminal B*. Il a en outre été montré qu'une expression élevée de HS3ST3A chez des tumeurs HER2+ était associée à un faible taux de survie (Mao *et al.*, 2016). Bien que nous n'ayons pas observé que la surexpression de HS3ST3A dans les cellules triples négatives MDA-MB-231 avait un effet antitumoral, nos résultats montrent que les effets induits par cette enzyme diffèrent de ceux induits par les autres HS3STs de type gD au sein d'un même type cellulaire. En ceci, ils sont en accord avec cette

étude. En revanche, les effets pro-tumoraux sont retrouvés lorsque les cellules expriment le récepteur HER2. Ces données ainsi que nos résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle il existerait de fines différences d'activité entre les HS3STs de type gD, probablement reliées à la présence ou à l'absence de substrats et de ligands spécifiques, ce qui conduit à des différences fonctionnelles. D'autres travaux seront nécessaires afin de mieux définir les substrats spécifiques de chaque HS3ST de type gD.

Dans leur ensemble, nos travaux suggèrent que les HS3ST2, 3B et 4 favorisent la progression tumorale chez les cellules MDA-MB-231 triples négatives. Les effets induits par la surexpression transitoire des HS3ST2, 3B, et 4 étant les mêmes, il est probable qu'une surexpression stable de HS3ST2 ou 4 mène aux mêmes effets que ceux observés avec HS3ST3B. La cancérisation entraîne un remodelage des mécanismes de régulation génétique et épigénétique de l'expression protéique, et changent par ce fait leur protéome. De plus, les cellules cancéreuses sont soumises à l'action du système immunitaire et sont tantôt dans un environnement anti-inflammatoire, tantôt dans un environnement pro-inflammatoire. Il a déjà été montré que l'expression des HS3ST2 et 3B était modulée respectivement par des stimuli anti- et pro-inflammatoires (Martinez *et al.*, 2013 ; Sikora *et al.*, 2015). Il est donc possible qu'en fonction du contexte inflammatoire, les cellules cancéreuses expriment une ou plusieurs HS3STs même si elles n'en exprimaient pas à la base. Ainsi, une augmentation progressive de l'expression des HS3ST2, 3B ou 4 pourrait conférer aux cellules des capacités accrues de prolifération et de résistance au système immunitaire. Nous proposons donc un modèle selon lequel l'expression d'au moins une de ces trois HS3STs de type gD mènerait à la synthèse d'HS 3-O-sulfatés favorisant l'interaction de la Nrp-1 et la formation de complexe avec un récepteur et son ligand, lequel pouvant être directement produit et sécrété par la cellule cancéreuse. Le complexe ainsi stabilisé permettrait de maintenir l'activation du récepteur membranaire, conduisant en une activation prolongée des voies de signalisation associées (Figure 41).

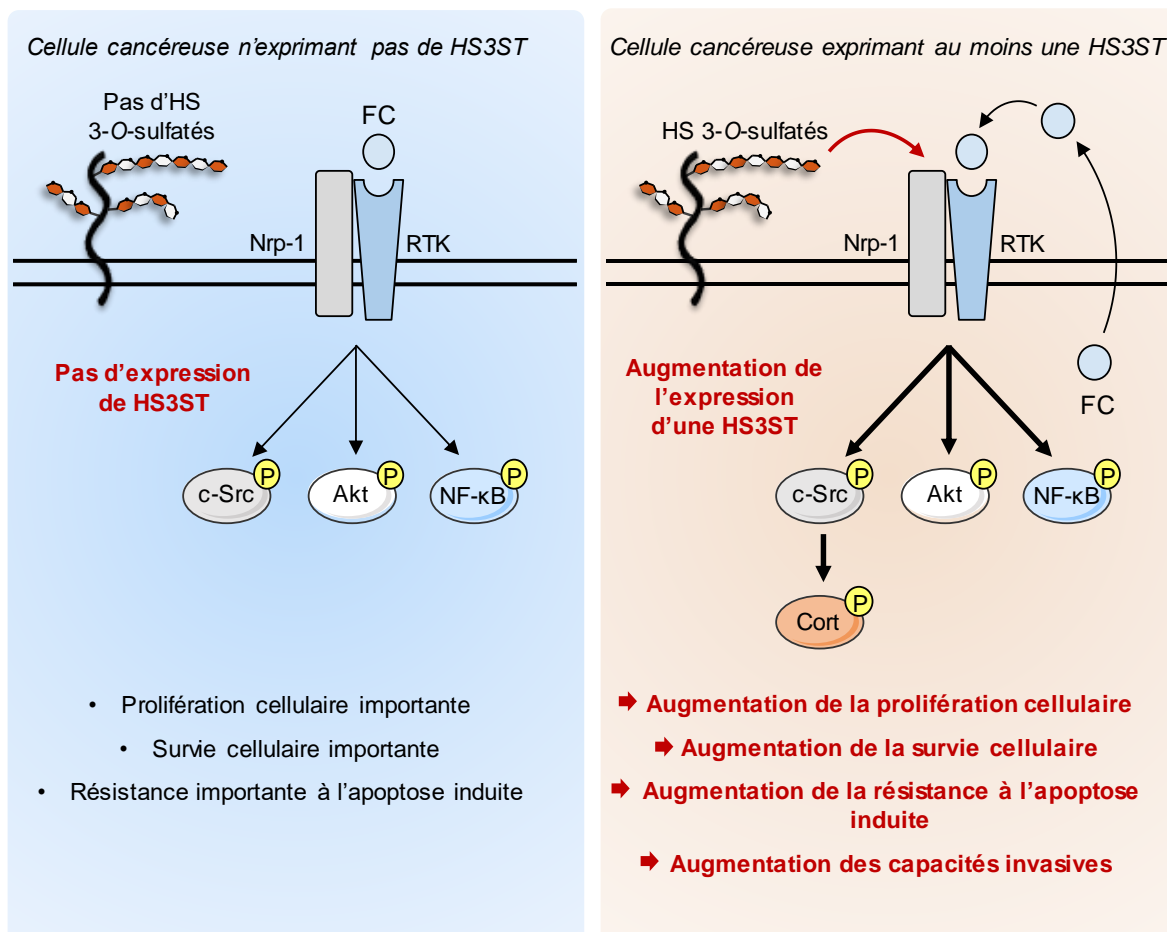


Figure 41 : Effet hypothétique de l'augmentation de l'expression des HS3STs chez les cellules cancéreuses. Cort : Cortactine, FC : Facteur de croissance, RTK : Récepteur Tyrosine Kinase.

Une des limites principales de ces travaux est le manque de données concernant l'expression des HS3STs *in situ*, au sein de tumeurs retrouvées chez des patients atteints de différents types de cancer. Si nous avons utilisé des cellules de cancer du sein comme modèle, il n'est pas exclu que les HS3STs puissent être exprimées dans différents types de cancer. En ce sens, il a été observé que les niveaux de HS3ST3B étaient augmentés dans des biopsies de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (Zhang *et al.*, 2018). L'augmentation de l'expression d'une protéine au cours de la cancérisation permet de l'utiliser comme marqueur pronostic. Un autre intérêt de cette étude serait donc de pouvoir utiliser les HS3STs comme marqueurs de l'évolution tumorale. Nous avons observé que l'expression de ces enzymes était associée à une augmentation prolongée de c-Src. Or, l'activation aberrante de c-Src est observée dans de très nombreuses formes de cancer (Irby & Yeatman, 2000 ; Krishnan *et al.*, 2018). Nos résultats suggèrent donc que les HS3STs pourraient être des marqueurs de mauvais pronostic.

Bibliographie

- Abu Arab, W., Kotb, R., Sirois, M., and Rousseau, É. (2011). Concentration- and time-dependent effects of enoxaparin on human adenocarcinomic epithelial cell line A549 proliferation *in vitro*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* *89*, 705–711.
- 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: GAG targeting in cancer cell biology. *FEBS Journal* *279*, 1177–1197.
- Agnelli, G., Fisher, W., Mouret, P., and Turpie, A.G.G. (2012). Semuloparin for Thromboprophylaxis in Patients Receiving Chemotherapy for Cancer. *The New England Journal of Medicine* *366*, 601–609.
- Agnelli, G., Gussoni, G., Bianchini, C., Verso, M., Mandalà, M., Cavanna, L., Barni, S., Labianca, R., Buzzi, F., Scambia, G., *et al.* (2009). Nadroparin for the prevention of thromboembolic events in ambulatory patients with metastatic or locally advanced solid cancer receiving chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *The Lancet Oncology* *10*, 943–949.
- 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. *The Journal of Cell Biology* *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. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 5876–5882.
- Aikawa, T., Whipple, C.A., Lopez, M.E., Gunn, J., Young, A., Lander, A.D., and Korc, M. (2008). Glypican-1 modulates the angiogenic and metastatic potential of human and mouse cancer cells. *Journal of Clinical Investigation* *118*, 89–99.
- Akl, E.A., van Doormaal, F.F., Barba, M., Kamath, G., Kim, S.Y., Kuipers, S., Middeldorp, S., Yosucio, V., Dickinson, H.O., and Schünemann, H.J. (2007). Parenteral anticoagulation for prolonging survival in patients with cancer who have no other indication for anticoagulation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Alexopoulou, A.N., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2007). Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *39*, 505–528.
- Altieri, D.C. (2010). Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochemical Journal* *430*, 199–205.
- An, J., and Lv, W. (2018). Endostar (rh-endostatin) versus placebo in combination with vinorelbine plus cisplatin chemotherapy regimen in treatment of advanced non-small cell lung cancer: A meta-analysis: Effect of Endostar in NSCLC. *Thoracic Cancer* *9*, 606–612.
- Andela, V.B., Schwarz, E.M., Puzas, J.E., O’Keefe, R.J., and Rosier, R.N. Tumor Metastasis and the Reciprocal Regulation of Prometastatic and Antimetastatic Factors by Nuclear Factor κB. *Cancer Research* *60*, 6557–6562.
- Anderegg, U., Simon, J.C., and Averbeck, M. (2014). More than just a filler - the role of hyaluronan for skin homeostasis. *Experimental Dermatology* *23*, 295–303.
- Andersen, N.F., Kristensen, I.B., Preiss, B.S., Christensen, J.H., and Abildgaard, N. (2015). Upregulation of Syndecan-1 in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma is associated with angiogenesis. *European Journal of Haematology* *95*, 211–217.
- Arikawa-Hirasawa, E., Le, A.H., Nishino, I., Nonaka, I., Ho, N.C., Francomano, C.A., Govindraj, P., Hassell, J.R., Devaney, J.M., Spranger, J., *et al.* (2002). Structural and Functional Mutations

- of the Perlecan Gene Cause Schwartz-Jampel Syndrome, with Myotonic Myopathy and Chondrodysplasia. *The American Journal of Human Genetics* *70*, 1368–1375.
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R., and Yamada, Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nature Genetics* *23*, 354–358.
- Arteel, G.E., Franken, S., Kappler, J., and Sies, H. (2000). Binding of Selenoprotein P to Heparin: Characterization with Surface Plasmon Resonance. *Biological Chemistry* *381*.
- Atha, D.H., Lormeau, J.-C., Petitou, M., Rosenberg, R.D., and Choay, J. (1985) Contribution of Monosaccharide Residues in Heparin Binding to Antithrombin III. *Biochemistry* *24*, 6723–6729.
- Atha, D.H., Lormeau, J.-C., Petitou, M., Rosenberg, R.D., and Choay, J. (1987). Contribution of 3-*O*- and 6-*O*-Sulfated Glucosamine Residues in the Heparin-Induced Conformational Change in Antithrombin III. *Biochemistry* *26*, 6454–6461.
- Atkinson, A., Garnier, S., Afridi, S., Fumoux, F., and Rihet, P. (2012). Genetic variations in genes involved in heparan sulphate biosynthesis are associated with *Plasmodium falciparum* parasitaemia: a familial study in Burkina Faso. *Malaria Journal* *11*, 108.
- Aung, N.Y., Ohe, R., Meng, H., Kabasawa, T., Yang, S., Kato, T., and Yamakawa, M. (2016). Specific Neuropilins Expression in Alveolar Macrophages among Tissue-Specific Macrophages. *PLoS One* *11*, e0147358.
- Aydin, O., Yildiz, L., Baris, S., Dundar, C., and Karagoz, F. (2015). Expression of Glypican 3 in low and high grade urothelial carcinomas. *Diagnostic Pathology* *10*.
- Bachelder, R.E., Crago, A., Chung, J., Wendt, M.A., Shaw, L.M., Robinson, G., and Mercurio, A.M. (2001). Vascular Endothelial Growth Factor Is an Autocrine Survival Factor for Neuropilin-expressing Breast Carcinoma Cells. *Cancer Research* *61*, 5736–5740.
- Bae, J., Desai, U.R., Pervin, A., Caldwell, E.E.O., Weiler, J.M., and Linhardt, R.J. (1994). Interaction of heparin with synthetic antithrombin III peptide analogues. *Biochemical Journal* *301*, 121–129.
- Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Watts, R.J. (2009). Neuropilins in Tumor Biology. *Clinical Cancer Research* *15*, 1860–1864.
- Balkwill, F.R., and Mantovani, A. (2012). Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology* *22*, 33–40.
- Bame, K.J., Zhang, L., David, G., and Esko, J.D. (1994). Sulphated and undersulphated heparan sulphate proteoglycans in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in *N*-sulphotransferase. *Biochemical Journal* *303*, 81–87.
- Barr, M.P., Byrne, A.M., Duffy, A.M., Condron, C.M., Devocelle, M., Harriott, P., Bouchier-Hayes, D.J., and Harmey, J.H. (2005). A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF165 induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *British Journal of Cancer* *92*, 328–333.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *290*, 11479–11490.
- Bass, M.D., Roach, K.A., Morgan, M.R., Mostafavi-Pour, Z., Schoen, T., Muramatsu, T., Mayer, U., Ballestrem, C., Spatz, J.P., and Humphries, M.J. (2007). Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology* *177*, 527–538.
- Bayer-Garner, I.B., Sanderson, R.D., Dhodapkar, M.V., Owens, R.B., and Wilson, C.S. (2001). Syndecan-1 (CD138) Immunoreactivity in Bone Marrow Biopsies of Multiple Myeloma: Shed Syndecan-1 Accumulates in Fibrotic Regions. *Modern Pathology* *14*, 1052–1058.

- Beauvais, D.M., Burbach, B.J., and Rapraeger, A.C. (2004). The syndecan-1 ectodomain regulates $\alpha_v\beta_3$ integrin activity in human mammary carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology* *167*, 171–181.
- Beauvais, D.M., Ell, B.J., McWhorter, A.R., and Rapraeger, A.C. (2009). Syndecan-1 regulates $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *The Journal of Experimental Medicine* *206*, 691–705.
- Beauvais, D.M., Ell, B.J., McWhorter, A.R., and Rapraeger, A.C. (2009). Syndecan-1 regulates $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *The Journal of Experimental Medicine* *206*, 691–705.
- Becker, M., Greune, L., Schmidt, M.A., and Schelhaas, M. (2018). Extracellular Conformational Changes in the Capsid of Human Papillomaviruses Contribute to Asynchronous Uptake into Host Cells. *Journal of Virology* *92*, e02106-17.
- Bennett, K.L. (1995). CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *The Journal of Cell Biology* *128*, 687–698.
- Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J.M., and Quintanilla, M. (2009). The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1792*, 954–973.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry* *68*, 729–777.
- Bespalov, M.M., Sidorova, Y.A., Tumova, S., Ahonen-Bishopp, A., Magalhães, A.C., Kuleskiy, E., Paveliev, M., Rivera, C., Rauvala, H., and Saarma, M. (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *The Journal of Cell Biology* *192*, 153–169.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 18724–18729.
- Bielenberg, D., Pettaway, C., Takashima, S., and Klagsbrun, M. (2006). Neuropilins in neoplasms: Expression, regulation, and function. *Experimental Cell Research* *312*, 584–593.
- Bilandzic, M., and Stenvers, K.L. (2011). Betaglycan: A multifunctional accessory. *Molecular and Cellular Endocrinology* *339*, 180–189.
- 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. *Nature Cell Biology* *15*, 818–828.
- Bishop, J.R., Crawford, B.E., and Esko, J.D. (2005). Cell Surface Heparan Sulfate Promotes Replication of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* *73*, 5395–5401.
- Bishop, J.R., Passos-Bueno, M.R., Fong, L., Stanford, K.I., Gonzales, J.C., Yeh, E., Young, S.G., Bensadoun, A., Witztum, J.L., Esko, J.D., *et al.* (2010). Deletion of the Basement Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan Type XVIII Collagen Causes Hypertriglyceridemia in Mice and Humans. *PLoS ONE* *5*, e13919.
- Bishop, J.R., Schuksz, M., and Esko, J.D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* *446*, 1030–1037.
- Bissinger, O., Kolk, A., Drecol, E., Straub, M., Lutz, C., Wolff, K., and Götz, C. (2017). EGFR and Cortactin: Markers for potential double target therapy in oral squamous cell carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine* *14*, 4620–4626.
- Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodaysky, I., Bovin, N.V., and Porgador, A. (2004). Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycans Are Involved in the Recognition of Cellular Targets by NKp30 and NKp46. *The Journal of Immunology* *173*, 2392–2401.

- Bobek, V., Boubelik, M., Fišerová, A., L'uptovcová, M., Vannucci, L., Kacprzak, G., Kolodziej, J., Majewski, A.M., and Hoffman, R.M. (2005). Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer. *Lung Cancer* *47*, 215–223.
- Boivin, W.A., Shackelford, M., Vanden Hoek, A., Zhao, H., Hackett, T.L., Knight, D.A., and Granville, D.J. (2012). Granzyme B Cleaves Decorin, Biglycan and Soluble Betaglycan, Releasing Active Transforming Growth Factor- β 1. *PLoS ONE* *7*, e33163.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodeling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *15*, 786–801.
- Bonnet, F., Périn, J.-P., Charbonnier, F., Camuzat, A., Roussel, G., Nussbaum, J.-L., and Alliel, P.M. (1996). Structure and Cellular Distribution of Mouse Brain Testican. Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 4373–4380.
- Borsig, L., Wong, R., Feramisco, J., Nadeau, D.R., Varki, N.M., and Varki, A. (2001). Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 3352–3357.
- Borza, D.-B., and Morgan, W.T. (1998). Histidine-Proline-rich Glycoprotein as a Plasma pH Sensor: Modulation of its interaction wFith glycosaminoglycans by pH and metals. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 5493–5499.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* *19*, 2474–2488.
- Brennan, T.V., Lin, L., Brandstadter, J.D., Rendell, V.R., Dredge, K., Huang, X., and Yang, Y. (2015). Heparan sulfate mimetic PG545-mediated antilymphoma effects require TLR9-dependent NK cell activation. *Journal of Clinical Investigation* *126*, 207–219.
- Brown, C.B., Boyer, A.S., Runyan, R.B., and Barnett, J.V. (1999). Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* *283*, 2080–2082.
- 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- β plaques in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* *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. *The Journal of Immunology* *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. *The FASEB Journal* *24*, 436–450.
- Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S.P., and Wilson, V.A. (1998). Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes & Development* *12*, 1894–1906.
- Burgess, R.W., Dickman, D.K., Nunez, L., Glass, D.J., and Sanes, J.R. (2002). Mapping sites responsible for interactions of agrin with neurons: Agrin-neuron interactions. *Journal of Neurochemistry* *83*, 271–284.
- Burgess, R.W., Skarnes, W.C., and Sanes, J.R. (2000). Agrin Isoforms with Distinct Amino Termini: Differential Expression, Localization, and Function. *The Journal of Cell Biology* *151*, 12.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 32802–32810.

- Busse-Wicher, M., Wicher, K.B., and Kusche-Gullberg, M. (2014). The extostoin family: Proteins with many functions. *Matrix Biology* *35*, 25–33.
- Cadwallader, A.B., and Yost, H.J. (2006a). Combinatorial expression patterns of heparan sulfate sulfotransferases in zebrafish: I. The 3-*O*-sulfotransferase family. *Developmental Dynamics* *235*, 3423–3431.
- Cadwallader, A.B., and Yost, H.J. (2006b). Combinatorial expression patterns of heparan sulfate sulfotransferases in zebrafish: II. The 6-*O*-sulfotransferase family. *Developmental Dynamics* *235*, 3432–3437.
- Caldwell, E.E.O., Nadkarni, V.D., Fromm, J.R., Linhardt, R.J., and Weiler, J.M. (1996). Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *28*, 203–216.
- Capila, I., and Linhardt, R.J. (2002). Heparin-Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* *41*, 390–412.
- Capila, I., Hernáiz, M.J., Mo, Y., Mealy, T.R., Campos, B., Dedman, J.R., Linhardt, R.J., and Seaton, B.A. (2001). Annexin V–Heparin Oligosaccharide Complex Suggests Heparan Sulfate–Mediated Assembly on Cell Surfaces. *Structure* *9*, 57–64.
- Cardin, A.D., and Weintraub, H.J. (1989). Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *9*, 21–32.
- Carfí, 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.
- Carter, N.M. (2003). Endothelial inflammation: the role of differential expression of N-deacetylase/N-sulphotransferase enzymes in alteration of the immunological properties of heparan sulphate. *Journal of Cell Science* *116*, 3591–3600.
- Cassinelli, G., Favini, E., Dal Bo, L., Tortoreto, M., De Maglie, M., Dagrada, G., Pilotti, S., Zunino, F., Zaffaroni, N., and Lanzi, C. (2016). Antitumor efficacy of the heparan sulfate mimic roneparstat (SST0001) against sarcoma models involves multi-target inhibition of receptor tyrosine kinases. *Oncotarget* *7*.
- 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. *Journal of Neurochemistry* *72*, 1681–1687.
- Castillo, L.F., Tascón, R., Huvelle, M.A.L., Novack, G., Llorens, M.C., Santos, A.F. dos, Shortrede, J., Cabanillas, A.M., Joffé, E.B. de K., Labriola, L., *et al.* (2016). Glypican-3 induces a mesenchymal to epithelial transition in human breast cancer cells. *Oncotarget* *7*.
- Casu, B., Guerrini, M., Guglieri, S., Naggi, A., Perez, M., Torri, G., Cassinelli, G., Ribatti, D., Carminati, P., Giannini, G., *et al.* (2004). Undersulfated and Glycol-Split Heparins Endowed with Antiangiogenic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* *47*, 838–848.
- Casu, B., Guerrini, M., Naggi, A., Perez, M., Torri, G., Ribatti, D., Carminati, P., Giannini, G., Penco, S., Pisano, C., *et al.* (2002). Short Heparin Sequences Spaced by Glycol-Split Uronate Residues Are Antagonists of Fibroblast Growth Factor 2 and Angiogenesis Inhibitors. *Biochemistry* *41*, 10519–10528.
- Casu, B., Naggi, A., and Torri, G. (2010). Heparin-derived heparan sulfate mimics to modulate heparan sulfate-protein interaction in inflammation and cancer. *Matrix Biology* *29*, 442–452.
- Catalano, A. (2006). Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* *107*, 3321–3329.
- Catalano, A. (2010). The Neuroimmune Semaphorin-3A Reduces Inflammation and Progression of Experimental Autoimmune Arthritis. *The Journal of Immunology* *185*, 6373–6383.
- Cecchi, F., Pajalunga, D., Fowler, C.A., Üren, A., Rabe, D.C., Peruzzi, B., MacDonald, N.J., Blackman, D.K., Stahl, S.J., Byrd, R.A., *et al.* (2012). Targeted Disruption of Heparan Sulfate

- Interaction with Hepatocyte and Vascular Endothelial Growth Factors Blocks Normal and Oncogenic Signaling. *Cancer Cell* *22*, 250–262.
- Chaudhary, B., Khaled, Y.S., Ammori, B.J., and Elkord, E. (2014). Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* *63*, 81–99.
- Chen, C.-P., Liu, S.-H., Lee, M.-Y., and Chen, Y.-Y. (2008). Heparan Sulfate Proteoglycans in the Basement Membranes of the Human Placenta and Decidua. *Placenta* *29*, 309–316.
- Cheng, F., Mani, K., van den Born, J., Ding, K., Belting, M., and Fransson, L.-Å. (2002). Nitric Oxide-dependent Processing of Heparan Sulfate in Recycling *S*-Nitrosylated Glypican-1 Takes Place in Caveolin-1-containing Endosomes. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 44431–44439.
- Cheng, W., Tseng, C.-J., Lin, T.T.C., Cheng, I., Pan, H.-W., Hsu, H.-C., and Lee, Y.-M. (2008). Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway. *Carcinogenesis* *29*, 1319–1326.
- Cheung, W.-F., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, 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.
- Choi, S., Lee, H., Choi, J.R., and Oh, E.S. (2010). Shedding; towards a new paradigm of syndecan function in cancer. *BMB Reports* *43*, 305–310.
- Christianson, H.C., and Belting, M. (2014). Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biology* *35*, 51–55.
- Christianson, H.C., Svensson, K.J., van Kuppevelt, T.H., Li, J.-P., and Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 17380–17385.
- Chu, W., Song, X., Yang, X., Ma, L., Zhu, J., He, M., Wang, Z., and Wu, Y. (2014). Neuropilin-1 Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Stimulating Nuclear Factor-Kappa B and Is Associated with Poor Prognosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* *9*, e101931.
- Cochran, S., Li, C., Fairweather, J.K., Kett, W.C., Coombe, D.R., and Ferro, V. (2003). Probing the Interactions of Phosphosulfomannans with Angiogenic Growth Factors by Surface Plasmon Resonance. *Journal of Medicinal Chemistry* *46*, 4601–4608.
- Cohen-Kaplan, V., Jrbashyan, J., Yanir, Y., Naroditsky, I., Ben-Izhak, O., Ilan, N., Doweck, I., and Vlodavsky, I. (2012). Heparanase Induces Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Protein Phosphorylation: preclinical and clinical significance in head and neck cancer. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 6668–6678.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 10488–10501.
- Cook, A., Blanton, S.H., Pauli, R.M., Gregg, R.G., Francomano, C.A., Puffenberger, E., Conrad, E.U., Schmale, G., Schellenberg, G., *et al.* (1993). Genetic Heterogeneity in Families with Hereditary Multiple Exostoses. *The American Journal of Human Genetics* *53*, 71–79.
- Coombe, D.R., and Kett, W.C. (2005). Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* *62*, 410–424.
- 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.
- Corbel, C., Lemarchandel, V., Thomas-Vaslin, V., Pelus, A.-S., Agboton, C., and Roméo, P.-H. (2007). Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Developmental & Comparative Immunology* *31*, 1082–1094.

- Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R., and Fässler, R. (1999). Perlecan Maintains the Integrity of Cartilage and Some Basement Membranes. *The Journal of Cell Biology* *147*, 1109–1122.
- Cotman, S.L., Halfter, W., and Cole, G.J. (1999). Identification of Extracellular Matrix Ligands for the Heparan Sulfate Proteoglycan Agrin. *Experimental Cell Research* *249*, 54–64.
- Couchman, J.R., Gopal, S., Lim, H.C., Nørgaard, S., and Multhaupt, H.A.B. (2015). Syndecans: from peripheral coreceptors to mainstream regulators of cell behaviour. *International Journal of Experimental Pathology* *96*, 1–10.
- Cui, X., Shen, D., Kong, C., Zhang, Z., Zeng, Y., Lin, X., and Liu, X. (2017). NF-κB suppresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating survivin expression in vitro and in vivo. *Scientific Reports* *7*.
- Das, S.K., Mallet, J.-M., Esnault, J., Driguez, P.-A., Duchaussoy, P., Sizun, P., Herault, J.-P., Herbert, J.-M., Petitou, M., and Sinaÿ, P. (2001). Synthesis of Conformationally Locked L-Iduronic Acid Derivatives: Direct Evidence for a Critical Role of the Skew-Boat2S0 Conformer in the Activation of Antithrombin by Heparin. *Chemistry - A European Journal* *7*, 4821–4834.
- Davis, F.M., Stewart, T.A., Thompson, E.W., and Monteith, G.R. (2014). Targeting EMT in cancer: opportunities for pharmacological intervention. *Trends in Pharmacological Sciences* *35*, 479–488.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 28115–28124.
- Deakin, J.A., and 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.
- Debatin, K.-M., and Krammer, P.H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* *23*, 2950–2966.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 1701–1715.
- Delos, M., Foulquier, F., Hellec, C., Vicogne, D., Fifre, A., Carpentier, M., Papy-Garcia, D., Allain, F., and Denys, A. (2018). Heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase 2 (HS3ST2) displays an unexpected subcellular localization in the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1862*, 1644–1655.
- Delos, M., Hellec, C., Foulquier, F., Carpentier, M., Allain, F., and Denys, A. (2016). Participation of 3-*O*-sulfated heparan sulfates in the protection of macrophages by herpes simplex virus-1 glycoprotein D and cyclophilin B against apoptosis. *FEBS Open Bio* *7*, 133–148.
- 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. *Biochemical Journal* *336*, 689–697.
- Denzer, A.J. (1998). Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *The EMBO Journal* *17*, 335–343.
- Dews, I.C., and MacKenzie, K.R. (2007). Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 20782–20787.
- Dhamija, R., Graham, J.M., Smaoui, N., Thorland, E., and Kirmani, S. (2014). Novel de novo SPOCK1 mutation in a proband with developmental delay, microcephaly and agenesis of corpus callosum. *European Journal of Medical Genetics* *57*, 181–184.

- Dierker, T., Bachvarova, V., Krause, Y., Li, J.-P., Kjellén, L., Seidler, D.G., and Vortkamp, A. (2016). Altered heparan sulfate structure in *Glyce-/-* mice leads to increased Hedgehog signaling in endochondral bones. *Matrix Biology* *49*, 82–92.
- Diestel, U., Resch, M., Meinhardt, K., Weiler, S., Hellmann, T.V., Mueller, T.D., Nickel, J., Eichler, J., and Muller, Y.A. (2013). Identification of a Novel TGF- β -Binding Site in the Zona Pellucida C-terminal (ZP-C) Domain of TGF- β -Receptor-3. *PLoS One* *8*, e67214.
- Dong, S., Cole, G.J., and Halfter, W. (2003). Expression of Collagen XVIII and Localization of Its Glycosaminoglycan Attachment Sites. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 1700–1707.
- Dredge, K., Brennan, T.V., Hammond, E., Lickliter, J.D., Lin, L., Bampton, D., Handley, P., Lankesheer, F., Morrish, G., Yang, Y., *et al.* (2018). A Phase I study of the novel immunomodulatory agent PG545 (pixatimod) in subjects with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer* *118*, 1035–1041.
- Dredge, K., Hammond, E., Davis, K., Li, C.P., Liu, L., Johnstone, K., Handley, P., Wimmer, N., Gonda, T.J., Gautam, A., *et al.* (2010). The PG500 series: novel heparan sulfate mimetics as potent angiogenesis and heparanase inhibitors for cancer therapy. *Investigational New Drugs* *28*, 276–283.
- Duchesne, L., Oceau, V., Bearon, R.N., Beckett, A., Prior, I.A., Lounis, B., and Fernig, D.G. (2012). Transport of Fibroblast Growth Factor 2 in the Pericellular Matrix Is Controlled by the Spatial Distribution of Its Binding Sites in Heparan Sulfate. *PLoS Biology* *10*, e1001361.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *339*, 1232–1237.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* *3*, 991–998.
- Dwivedi, P.P., Lam, N., and Powell, B.C. (2013). Boning up on glypicans-opportunities for new insights into bone biology. *Cell Biochemistry and Function* *31*, 91–114.
- Dzwonek, J., and Wilczynski, G.M. (2015). CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience* *9*.
- Edavettal, S.C., Lee, K.A., Negishi, M., Linhardt, R.J., Liu, J., and Pedersen, L.C. (2004). Crystal Structure and Mutational Analysis of Heparan Sulfate 3-*O*-Sulfotransferase Isoform 1. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 25789–25797.
- Edge, S.B., and Spirog, G. Characterization of Novel Sequences Containing 3-*O*-Sulfated Glucosamine in Glomerular Basement Membrane Heparan Sulfate and Localization of Sulfated Disaccharides to a Peripheral Domain. *9*.
- Elkin, M., Ilan, N., Ishai-Michaeli, R., Friedmann, Y., Papo, O., Pecker, I., and Vlodavsky, I. (2001). Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *The FASEB Journal* *15*, 1661–1663.
- Ellis, L.M. (2006). The role of neuropilins in cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* *5*, 1099–1107.
- Erickson, A.C., and Couchman, J.R. (2000). Still More Complexity in Mammalian Basement Membranes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* *48*, 1291–1306.
- Escudero-Esparza (2009). PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2 and the PGF receptor, neuropilin, in human breast cancer: Prognostic significance. *Oncology Reports* *23*.
- Esko, J.D., and Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *The Journal of Clinical Investigation* *108*, 5.
- Esko, J.D., and Selleck, S.B. (2002). Order Out of Chaos: Assembly of Ligand Binding Sites in Heparan Sulfate. *Annual Review of Biochemistry* *71*, 435–471.
- Essner, J., Chen, E., and Ekker, S. (2006). Syndecan-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *38*, 152–156.

- Faham, S., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Linhardt, R.J., and Rees, D.C. (1996). Heparin Structure and Interactions with Basic Fibroblast Growth Factor. *Science* *271*, 1116–1120.
- Falanga, A., and Marchetti, M. (2007). Heparin in Tumor Progression and Metastatic Dissemination. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* *33*, 688–694.
- Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A., and Balducci, D. (2003) Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression. *Clinical Advance in Hematology & Oncology* *1*, 673–678.
- Fan, G., Xiao, L., Cheng, L., Wang, X., Sun, B., and Hu, G. (2000). Targeted disruption of NDST-1 gene leads to pulmonary hypoplasia and neonatal respiratory distress in mice. *FEBS Letters* *467*, 7–11.
- Farach-Carson, M.C., Warren, C.R., Harrington, D.A., and Carson, D.D. (2014). Border patrol: Insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix Biology* *34*, 64–79.
- Fears, C.Y., Gladson, C.L., and Woods, A. (2006). Syndecan-2 Is Expressed in the Microvasculature of Gliomas and Regulates Angiogenic Processes in Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 14533–14536.
- 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*, 1–14.
- Fernández-Vega, I., García, O., Crespo, A., Castañón, S., Menéndez, P., Astudillo, A., and Quirós, L.M. (2013). Specific genes involved in synthesis and editing of heparan sulfate proteoglycans show altered expression patterns in breast cancer. *BMC Cancer* *13*.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 36132–36146.
- Ferro, V., Fewings, K., Palermo, M.C., and Li, C. (2001). Large-scale preparation of the oligosaccharide phosphate fraction of *Pichia holstii* NRRL Y-2448 phosphomannan for use in the manufacture of PI-88. *Carbohydrate Research* *332*, 183–189.
- Feyerabend, T.B., Li, J.-P., Lindahl, U., and Rodewald, H.-R. (2006). Heparan sulfate C5-epimerase is essential for heparin biosynthesis in mast cells. *Nature Chemical Biology* *2*, 195–196.
- Filmus, J., and Capurro, M. (2014). The role of glypicans in Hedgehog signaling. *Matrix Biology* *35*, 248–252.
- Filmus, J., Capurro, M., and Rast, J. (2008). Glypicans. *Genome Biology* *9*, 224.
- Foguer, K., Braga, M. de S., Peron, J.P.S., Bortoluci, K.R., and Bellini, M.H. (2016). Endostatin gene therapy inhibits intratumoral macrophage M2 polarization. *Biomedicine & Pharmacotherapy* *79*, 102–111.
- Folkman, J. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *Journal of Experimental Medicine* *133*, 275–288.
- Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R., Haudenschild, C., and Taylor, S. (1983). Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* *221*, 719–725.
- Francis, D.J. (2003). Blockade of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Intimal Thickening After Balloon Injury by the Sulfated Oligosaccharide PI-88: Phosphomannopentaose Sulfate Directly Binds FGF-2, Blocks Cellular Signaling, and Inhibits Proliferation. *Circulation Research* *92*, 70–77.
- Frankel, P., Pellet-Many, C., Lehtolainen, P., D'Abaco, G.M., Tickner, M.L., Cheng, L., and Zachary, I.C. (2008). Chondroitin sulphate-modified neuropilin 1 is expressed in human tumour cells

- and modulates 3D invasion in the U87MG human glioblastoma cell line through a p130Cas-mediated pathway. *EMBO Reports* *9*, 983–989.
- Fransson, L.-A., Belting, M., Cheng, F., Jönsson, M., Mani, K., and Sandgren, S. (2004). Novel aspects of glypican glycobiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* *61*, 1016–1024.
- Fransson, L.-A., Silverberg, I., and Carlstedt, I. Structure of the heparan sulfate-protein linkage region. Demonstration of the sequence galactosyl-galactosyl-xylose-2-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* *260*, 14722–6.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 28033–28044.
- Frevert, U., Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B., and Nussenzweig, V. (1993). Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *The Journal of Experimental Medicine* *177*, 1287–1288.
- Fromm, J.R., Hileman, R.E., Caldwell, E.E.O., Weiler, J.M., and Linhardt, R.J. (1997a). Pattern and Spacing of Basic Amino Acids in Heparin Binding Sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *343*, 92–100.
- Fromm, J.R., Hileman, R.E., Weiler, J.M., and Linhardt, R.J. (1997b). Interaction of Fibroblast Growth Factor-1 and Related Peptides with Heparan Sulfate and Its Oligosaccharides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *346*, 252–262.
- Fuh, G., Garcia, K.C., and de Vos, A.M. (2000). The interaction of Neuropilin-1 with Vascular Endothelial Growth Factor and its receptor Flt-1. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 26690–26695.
- Fujii, T., Shimada, K., Tatsumi, Y., Tanaka, N., Fujimoto, K., and Konishi, N. (2016). Syndecan-1 up-regulates microRNA-331-3p and mediates epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *Molecular Carcinogenesis* *55*, 1378–1386.
- Fujisawa, H. (2002). From The Discovery of Neuropilin to the Determination of Its Adhesion Sites. *Advances in Experimental Medicine and Biology* *515*, 1–12.
- Funderburgh, J.L. (2000). Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* *10*, 951–958.
- Funderburgh, J.L. (2002). Keratan Sulfate Biosynthesis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* *54*, 187–194.
- Gallagher, J.T. (2015). Heparan sulphate and the art of cell regulation: a polymer chain conducts the protein orchestra. *International Journal of Experimental Pathology* *96*, 203–231.
- Gandhi, N.S., and Mancera, R.L. (2008). The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design* *72*, 455–482.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1840*, 1993–2003.
- Genna, A., Lapetina, S., Lukic, N., Twafra, S., Meirson, T., Sharma, V.P., Condeelis, J.S., and Gil-Henn, H. (2018). Pyk2 and FAK differentially regulate invadopodia formation and function in breast cancer cells. *The Journal of Cell Biology* *217*, 375–395.
- Ghiselli, G., and Agrawal, A. (2005). The human D-glucuronyl C5-epimerase gene is transcriptionally activated through the β -catenin–TCF4 pathway. *Biochemical Journal* *390*, 493–499.
- Ginath, S., Menczer, J., Friedmann, Y., Aingorn, H., Aviv, A., Tajima, K., Dantes, A., Glezerman, M., Vlodavsky, I., and Amsterdam, A. (2001). Expression of heparanase, Mdm2, and erbB2 in ovarian cancer. *International Journal of Oncology*.

- González-Iglesias, R., Pajares, M.A., Ocal, C., Carlos Espinosa, J., Oesch, B., and Gasset, M. (2002). Prion Protein Interaction with Glycosaminoglycan Occurs with the Formation of Oligomeric Complexes Stabilized by Cu(II) Bridges. *Journal of Molecular Biology* *319*, 527–540.
- Greenfield, B., Wang, W.-C., Marquardt, H., Piepkorn, M., Wolff, E.A., Aruffo, A., and Bennett, K.L. (1999). Characterization of the Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate Assembly Sites in CD44. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 2511–2517.
- Grigorieva, E.V., Prudnikova, T.Y., Domanitskaya, N.V., Mostovich, L.A., Pavlova, T.V., Kashuba, V.I., and Zabarovsky, E.R. (2011). D-Glucuronyl C5-epimerase suppresses small-cell lung cancer cell proliferation *in vitro* and tumour growth *in vivo*. *British Journal of Cancer* *105*, 74–82.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1573*, 209–215.
- Groffen, A.J., Ruegg, M.A., Dijkman, H., van de Velden, T.J., Buskens, C.A., van den Born, J., Assmann, K.J., Monnens, L.A., Veerkamp, J.H., and van den Heuvel, L.P. (1998). Agrin Is a Major Heparan Sulfate Proteoglycan in the Human Glomerular Basement Membrane. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* *46*, 19–27.
- Gross-Cohen, M., Feld, S., Doweck, I., Neufeld, G., Hasson, P., Arvatz, G., Barash, U., Naroditsky, I., Ilan, N., and Vlodavsky, I. (2016). Heparanase 2 Attenuates Head and Neck Tumor Vascularity and Growth. *Cancer Research* *76*, 2791–2801.
- Gu, C., Limberg, B.J., Whitaker, G.B., Perman, B., Leahy, D.J., Rosenbaum, J.S., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2002). Characterization of Neuropilin-1 Structural Features That Confer Binding to Semaphorin 3A and Vascular Endothelial Growth Factor 165. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 18069–18076.
- Guerrini, M., Elli, S., Mourier, P., Rudd, T.R., Gaudesi, D., Casu, B., Boudier, C., Torri, G., and Viskov, C. (2013). An unusual antithrombin-binding heparin octasaccharide with an additional 3-*O*-sulfated glucosamine in the active pentasaccharide sequence. *Biochemical Journal* *449*, 343–351.
- Gulberti, S., Jacquinet, J.-C., Chabel, M., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., Netter, P., Coughtrie, M.W.H., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2012). Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (CSGalNAcT-1) involved in chondroitin sulfate initiation: Impact of sulfation on activity and specificity. *Glycobiology* *22*, 561–571.
- 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 β 1,4-Galactosyltransferase 7 (GalT-I) and β 1,3-Glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) Involved in the Biosynthesis of the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* *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. *Journal of Genetics and Genomics* *41*, 369–378.
- Guo, Y., Li, Z., and Lin, X. (2014b). Hs3st-A and Hs3st-B regulate intestinal homeostasis in *Drosophila* adult midgut. *Cellular Signalling* *26*, 2317–2325.
- Guttmann-Raviv, N., Kessler, O., Shraga-Heled, N., Lange, T., Herzog, Y., and Neufeld, G. (2006). The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Letters* *231*, 1–11.
- Habuchi, H., and Kimata, K. (2010). Mice Deficient in Heparan Sulfate 6-*O*-Sulfotransferase-1. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* *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. *Journal of Biological Chemistry* *270*, 4172–4179.
- 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. *Biochemical Journal* *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. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 15578–15588.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 2859–2868.
- Habuchi, O. (2000). Diversity and functions of glycosaminoglycan sulfotransferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1474*, 115–127.
- Häcker, U., Lin, X., and Perrimon, N. (1997). The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development* *124*, 3565–3573.
- Hagner-McWhirter, Å., Li, J.-P., Oscarson, S., and Lindahl, U. (2004). Irreversible Glucuronyl C5-epimerization in the Biosynthesis of Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 14631–14638.
- Hagner-McWhirter, A., Lindahl, U., and Li, J. (2000). Biosynthesis of heparin/heparan sulphate: mechanism of epimerization of glucuronyl C-5. *Biochemistry* *347*, 69–75.
- HajMohammadi, S., Enjyoji, K., Princivalle, L., Christi, P., Lech, M., Beeler, D., Rayburn, H., Schwartz, J.J., Barzegar, S., de Agostini, A.I., *et al.* Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis. *The Journal of Clinical Investigation* *111*, 989–999.
- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B., and Cole, G.J. (1998). Collagen XVIII Is a Basement Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 25404–25412.
- Hammond, E., Haynes, N.M., Cullinane, C., Brennan, T.V., Bampton, D., Handley, P., Karoli, T., Lanksheer, F., Lin, L., Yang, Y., *et al.* (2018). Immunomodulatory activities of pixatimod: emerging nonclinical and clinical data, and its potential utility in combination with PD-1 inhibitors. *Journal for Immunotherapy of Cancer* *6*.
- Han, X., Guo, B., Li, Y., and Zhu, B. (2014). Tissue factor in tumor microenvironment: a systematic review. *Journal of Hematology & Oncology* *7*.
- Handin, R.I., and Cohen, H. (1976). Purification and Binding Properties of Human Platelet Factor Four. *Journal of Biological Chemistry* *251*, 4273–4282.
- Hartmann, U., Hülsmann, H., Seul, J., Röhl, S., Midani, H., Breloy, I., Hechler, D., Müller, R., and Paulsson, M. (2013). Testican-3: a brain-specific proteoglycan member of the BM-40/SPARC/osteonectin family. *Journal of Neurochemistry* *125*, 399–409.
- Hasegawa, H., and Wang, F. (2008). Visualizing mechanosensory endings of TrkC-expressing neurons in HS3ST-2-hPLAP mice. *The Journal of Comparative Neurology* *511*, 543–556.
- Hassell, J., Yamada, Y., and Arikawa-Hirasawa, E. (2002). Role of perlecan in skeletal development and diseases. *Glycoconjugate Journal* *19*, 263–267.

- 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. *Molecular and Clinical Oncology* *1*, 845–850.
- Häuselmann, I., and Borsig, L. (2014). Altered Tumor-Cell Glycosylation Promotes Metastasis. *Frontiers in Oncology* *4*.
- Hayes, K.E., Walk, E.L., Ammer, A.G., Kelley, L.C., Martin, K.H., and Weed, S.A. (2013). ABL5 kinases negatively regulate invadopodia function and invasion in head and neck squamous cell carcinoma by inhibiting an HB-EGF autocrine loop. *Oncogene* *32*, 4766–4777.
- Haynes, A., Ruda, F., Oliver, J., Hamood, A.N., Griswold, J.A., Park, P.W., and Rumbaugh, K.P. (2005). Syndecan 1 Shedding Contributes to *Pseudomonas aeruginosa* Sepsis. *Infection and Immunity* *73*, 7914–7921.
- Hazel, S.J. (2003). A novel early chorioallantoic membrane assay demonstrates quantitative and qualitative changes caused by antiangiogenic substances. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* *141*, 217–228.
- Hellec, C., Delos, M., Carpentier, M., Denys, A., and Allain, F. (2018). The heparan sulfate 3-O-sulfotransferases (HS3ST) 2, 3B and 4 enhance proliferation and survival in breast cancer MDA-MB-231 cells. *PLOS ONE* *13*, e0194676.
- Hileman, R.E., Fromm, J.R., Weiler, J.M., and Linhardt, R.J. (1998a). Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *BioEssays* *20*, 156–167.
- Hileman, R.E., Jennings, R.N., and Linhardt, R.J. (1998b). Thermodynamic Analysis of the Heparin Interaction with a Basic Cyclic Peptide Using Isothermal Titration Calorimetry. *Biochemistry* *37*, 15231–15237.
- 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 Contribute to the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells *via* Fas Signaling. *PLoS ONE* *7*, e43440.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *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.
- Hong, T.-M., Chen, Y.-L., Wu, Y.-Y., Yuan, A., Chao, Y.-C., Chung, Y.-C., Wu, M.-H., Yang, S.-C., Pan, S.-H., Shih, J.-Y., *et al.* (2007). Targeting Neuropilin 1 as an Antitumor Strategy in Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* *13*, 4759–4768.
- Höök, M., Björk, I., Hopwood, J., and Lindahl, U. (1976). Anticoagulant activity of heparin: Separation of high-activity and low-activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin. *FEBS Letters* *66*, 90–93.
- Hopwood, J., Höök, M., Linker, A., and Lindahl, U. (1976). Anticoagulant activity of heparin: Isolation of antithrombin-binding sites. *FEBS Letters* *69*, 51–54.
- Horssen, J., Wilhelmus, M.M.M., Heljasvaara, R., Pihlajaniemi, T., Wesseling, P., Waal, R.M.W., and Verbeek, M.M. (2006). Collagen XVIII: a Novel Heparan Sulfate Proteoglycan Associated with Vascular Amyloid Depositions and Senile Plaques in Alzheimer's Disease Brains. *Brain Pathology* *12*, 456–462.
- Hu, Y.-P., Lin, S.-Y., Huang, C.-Y., Zulueta, M.M.L., Liu, J.-Y., Chang, W., and Hung, S.-C. (2011). Synthesis of 3-O-sulfonated heparan sulfate octasaccharides that inhibit the herpes simplex virus type 1 host-cell interaction. *Nature Chemistry* *3*, 557–563.

- Huiqi, G., Jing, Z., Peng, F., Yong, L., and Baozhong, S. *In vivo* study of the effect of combining endostatin gene therapy with ³²P-colloid on hepatocarcinoma and its functioning mechanism. 6.
- Hull, E., Montgomery, M., and Leyva, K. (2017). Epigenetic Regulation of the Biosynthesis & Enzymatic Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans: Implications for Tumorigenesis and Cancer Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1361.
- Humphries, D.E., Sullivan, B.M., Aleixo, M.D., and Stow, J.L. (1997). Localization of human heparan glucosaminyl *N*-deacetylase/*N*-sulphotransferase to the trans-Golgi network. *Biochemical Journal* 325, 351–357.
- Hwang, J.-A., Kim, Y., Hong, S.-H., Lee, J., Cho, Y.G., Han, J.-Y., Kim, Y.-H., Han, J., Shim, Y.M., Lee, Y.-S., *et al.* (2013). Epigenetic Inactivation of Heparan Sulfate (Glucosamine) 3-*O*-Sulfotransferase 2 in Lung Cancer and Its Role in Tumorigenesis. *PLoS ONE* 8, e79634.
- Ibrahim, S.A., Hassan, H., and Götte, M. (2014). MicroRNA regulation of proteoglycan function in cancer. *FEBS Journal* 281, 5009–5022.
- Imberty, A., Lortat-Jacob, H., and Pérez, S. (2007). Structural view of glycosaminoglycan–protein interactions. *Carbohydrate Research* 342, 430–439.
- Iozzo, R.V. (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 646–656.
- Iozzo, R.V., and Sanderson, R.D. (2011). Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15, 1013–1031.
- Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology* 42, 11–55.
- Iravani, O., Bay, B.-H., and Yip, G.W.-C. (2017). Silencing HS6ST3 inhibits growth and progression of breast cancer cells through suppressing IGF1R and inducing XAF1. *Experimental Cell Research* 350, 380–389.
- Irby, R.B., and Yeatman, T.J. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19, 5636–5642.
- Ishiguro, K., Kadomatsu, K., Kojima, T., Muramatsu, H., Tsuzuki, S., Nakamura, E., Kusugami, K., Saito, H., and Muramatsu, T. (2000). Syndecan-4 Deficiency Impairs Focal Adhesion Formation Only under Restricted Conditions. *Journal of Biological Chemistry* 275, 5249–5252.
- Ito, Y., Yoshida, H., Nakano, K., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Yokozawa, T., Matsuzuka, F., Matsuura, N., Kuma, K., *et al.* (2003). Syndecan-1 expression in thyroid carcinoma: stromal expression followed by epithelial expression is significantly correlated with dedifferentiation. *Histopathology* 43, 157–164.
- Itoh, K., Nakao, A., Kishimoto, W., and Takagi, H. (1995). Heparin Effects on Superoxide Production by Neutrophils. *European Surgical Research* 27, 184–188.
- Ivetic, A. (2018). A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. *Cell and Tissue Research* 371, 437–453.
- Jakobsson, L., Kreuger, J., Holmborn, K., Lundin, L., Eriksson, I., Kjellén, L., and Claesson-Welsh, L. (2006). Heparan Sulfate in trans Potentiates VEGFR-Mediated Angiogenesis. *Developmental Cell* 10, 625–634.
- Jao, T.-M., Li, Y.-L., Lin, S.-W., Tzeng, S.-T., Yu, I.-S., Yen, S.-J., Tsai, M.-H., and Yang, Y.-C. (2016). Alteration of colonic epithelial cell differentiation in mice deficient for glucosaminyl *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase 4. *Oncotarget* 7.
- Javadinia, S.A., Gholami, A., Joudi Mashhad, M., Ferns, G.A., Shahidsales, S., Avan, A., and Kermani, A.T. (2018). Anti-tumoral effects of low molecular weight heparins: A focus on the treatment of esophageal cancer. *Journal of Cellular Physiology* 233, 6523–6529.

- Jemth, P., Smeds, E., Do, A.-T., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U., and Kusche-Gullberg, M. (2003). Oligosaccharide Library-based Assessment of Heparan Sulfate 6- *O*-Sulfotransferase Substrate Specificity. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 24371–24376.
- Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L.P., Mohan, S., Rataul, M., O’Keefe, C., Sekeres, M., Sauntharajah, Y., and Maciejewski, J.P. (2009). Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *113*, 12.
- Johnson, Z., Kosco-Vilbois, M.H., Herren, S., Cirillo, R., Muzio, V., Zaratin, P., Carbonatto, M., Mack, M., Smailbegovic, A., Rose, M., *et al.* (2004). Interference with Heparin Binding and Oligomerization Creates a Novel Anti-Inflammatory Strategy Targeting the Chemokine System. *The Journal of Immunology* *173*, 5776–5785.
- Johnstone, K.D., Karoli, T., Liu, L., Dredge, K., Copeman, E., Li, C.P., Davis, K., Hammond, E., Bytheway, I., Kostewicz, E., *et al.* (2010). Synthesis and Biological Evaluation of Polysulfated Oligosaccharide Glycosides as Inhibitors of Angiogenesis and Tumor Growth. *Journal of Medicinal Chemistry* *53*, 1686–1699.
- Joubert, B.R., Lange, E.M., Franceschini, N., Mwapasa, V., North, K.E., Meshnick, S.R., and the NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (2010). A whole genome association study of mother-to-child transmission of HIV in Malawi. *Genome Medicine* *2*, 17.
- Joyce, J.A., Freeman, C., Meyer-Morse, N., Parish, C.R., and Hanahan, D. (2005). A functional heparan sulfate mimetic implicates both heparanase and heparan sulfate in tumor angiogenesis and invasion in a mouse model of multistage cancer. *Oncogene* *24*, 4037–4051.
- Jung, D.-B., Yun, M., Kim, E.-O., Kim, J., Kim, B., Jung, J.H., Wang, E., Mukhopadhyay, D., Hammond, E., Dredge, K., *et al.* (2015). The heparan sulfate mimetic PG545 interferes with Wnt/ β -catenin signaling and significantly suppresses pancreatic tumorigenesis alone and in combination with gemcitabine. *Oncotarget* *6*, 4992–5004.
- Jury, E.C., and Kabouridis, P.S. (2010). New role for Agrin in T cells and its potential importance in immune system regulation. *Arthritis Research & Therapy* *12*, 205.
- Justus, C.R., Dong, L., and Yang, L.V. (2013). Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Frontiers in Physiology* *4*.
- Kamimura, K., Koyama, T., Habuchi, H., Ueda, R., Masu, M., Kimata, K., and Nakato, H. (2006). Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in *Drosophila* FGF signaling. *The Journal of Cell Biology* *174*, 773–778.
- 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. *The Journal of Cell Biology* *166*, 1069–1079.
- Kan, M., Wang, F., Xu, J., Crabb, J.W., Hou, J., and McKeehan, W.L. (1993). An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science* *259*, 1918–1921.
- Kanwar, Y.S. (1980). Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *The Journal of Cell Biology* *86*, 688–693.
- Karger, A., Saalmüller, A.S., Tufaro, F., Banfield, B.W., and Mettenleiter, T.C. (1995). Cell Surface Proteoglycans Are Not Essential for Infection by Pseudorabies Virus. *Journal of Virology* *69*, 3482–3489.
- Karibe, T., Fukui, H., Sekikawa, A., Shiratori, K., and Fujimori, T. (2008). *EXTL3* promoter methylation down-regulates *EXTL3* and heparan sulphate expression in mucinous colorectal cancers. *The Journal of Pathology* *216*, 32–42.
- Kassim, S.K., Shehata, H.H., Abou-Alhussein, M.M., Sallam, M.M., and Amin, I.I. (2017). Laboratory validation of formal concept analysis of the methylation status of microarray-detected genes in primary breast cancer. *Tumor Biology* *39*, 101042831769839.

- 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. *Journal of Biological Chemistry* *290*, 13168–13177.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* *126*, 4895–4902.
- Khorana, A.A. (2012). Cancer and coagulation. *American Journal of Hematology* *87*, S82–S87.
- Khotskaya, Y.B., Dai, Y., Ritchie, J.P., MacLeod, V., Yang, Y., Zinn, K., and Sanderson, R.D. (2009). Syndecan-1 Is Required for Robust Growth, Vascularization, and Metastasis of Myeloma Tumors *in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 26085–26095.
- Kim, B.-T., Kitagawa, H., Tamura, J.-I., Saito, T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., and Sugahara, K. (2001). Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode 1,4- *N*-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *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.
- Kirkbride, K.C., Townsend, T.A., Bruinsma, M.W., Barnett, J.V., and Blobe, G.C. (2008). Bone Morphogenetic Proteins Signal through the Transforming Growth Factor- β Type III Receptor. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 7628–7637.
- Kitagawa, H., Shimakawa, H., and Sugahara, K. (1999). The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an α 2,4-*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. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 13933–13937.
- Kitagawa, H., Tanaka, Y., Tsuchida, K., Goto, F., Ogawa, T., Lidholt, K., Lindahl, U., and Sugahara, K. (1995). *N*-Acetylgalactosamine (GalNAc) Transfer to the Common Carbohydrate-Protein Linkage Region of Sulfated Glycosaminoglycans. Identification of UDP-GalNAc: chondro-oligosaccharide α -N-acetylgalactosaminyltransferase in fetal bovine serum. *Journal of Biological Chemistry* *270*, 22190–22195.
- Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ikegami-Kuzuhara, A., Nadanaka, S., Goto, F., Ogawa, T., and Sugahara, K. (2008). Sulfation of the Galactose Residues in the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region by Recombinant Human Chondroitin 6-*O*-Sulfotransferase-1. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 27438–27443.
- Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1997). Neuropilin–Semaphorin III/D-Mediated Chemorepulsive Signals Play a Crucial Role in Peripheral Nerve Projection in Mice. *Neuron* *19*, 995–1005.
- Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., and Fujisawa, H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *10*.
- 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. *Journal of Cell Science* *102*, 821–832.
- Knelson, E.H., Nee, J.C., and Blobe, G.C. (2014). Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends in Biochemical Sciences* *39*, 277–288.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Yoneda, M., Habuchi, O., and Kimata, K. (1997). Molecular Cloning and Expression of Chinese Hamster Ovary Cell Heparan-sulfate 2-Sulfotransferase. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 13980–13985.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *268*, 860–867.

- Koenig, A., Norgard-Sumnicht, K., Linhardt, R., and Varki, A. (1998). Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *Journal of Clinical Investigation* *101*, 877–889.
- Koike, T., Izumikawa, T., Sato, B., and Kitagawa, H. (2014). Identification of Phosphatase That Dephosphorylates Xylose in the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 6695–6708.
- Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J.-I., and Kitagawa, H. (2009). FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan–protein linkage region. *Biochemical Journal* *421*, 157–162.
- Koliopanos, A., Friess, H., Kleeff, J., Shi, X., Liao, Q., Pecker, I., Vlodavsky, I., and Zimmermann, A. (2001). Heparanase Expression in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer. *Cancer Research* *61*, 4655–4659.
- Kolset, S.O., and Tveit, H. (2008). Serglycin – Structure and biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* *65*, 1073–1085.
- Korpetinou, A., Skandalis, S.S., Labropoulou, V.T., Smirlaki, G., Noulas, A., Karamanos, N.K., and Theocharis, A.D. (2014). Serglycin: At the Crossroad of Inflammation and Malignancy. *Frontiers in Oncology* *3*.
- Koziel, L., Kunath, M., Kelly, O.G., and Vortkamp, A. (2004). Ext1-Dependent Heparan Sulfate Regulates the Range of Ihh Signaling during Endochondral Ossification. *Developmental Cell* *6*, 801–813.
- Kramer, K.L., and Yost, H.J. (2002). Ectodermal Syndecan-2 Mediates Left-Right Axis Formation in Migrating Mesoderm as a Cell-Nonautonomous Vg1 Cofactor. *Developmental Cell* *2*, 115–124.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *375*, 297–302.
- Kreuger, J., and Kjellén, L. (2012). Heparan Sulfate Biosynthesis: Regulation and Variability. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* *60*, 898–907.
- Krishnan, H., Miller, W.T., Blanco, F.J., and Goldberg, G.S. (2018). Src and podoplanin forge a path to destruction. *Drug Discovery Today*.
- Kubo, S., Takagi-Kimura, M., and Kasahara, N. (2015). Combinatorial anti-angiogenic gene therapy in a human malignant mesothelioma model. *Oncology Reports* *34*, 633–638.
- Kuderer, N.M., Khorana, A.A., Lyman, G.H., and Francis, C.W. (2007). A meta-analysis and systematic review of the efficacy and safety of anticoagulants as cancer treatment: Impact on survival and bleeding complications. *Cancer* *110*, 1149–1161.
- Kurosawa, N., Chen, G.-Y., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Sakuma, S., and Muramatsu, T. (2001). Glypican-2 binds to midkine: The role of glypican-2 in neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *Glycoconjugate Journal* *18*, 499–507.
- Kusche-Gullberg, M. (2003). Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology* *13*, 605–611.
- Lamanna, W.C., Baldwin, R.J., Padvá, 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. *Biochemical Journal* *400*, 63–73.
- Lambert, S., Bouttier, M., Vassy, R., Seigneuret, M., Petrow-Sadowski, C., Janvier, S., Heveker, N., Ruscetti, F.W., Perret, G., Jones, K.S., *et al.* (2009). HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* *113*, 5176–5185.

- Lander, A.D., Nie, Q., and Wan, F.Y.. (2002). Do Morphogen Gradients Arise by Diffusion? *Developmental Cell* *2*, 785–796.
- Lardner, A. (2001). The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of Leukocyte Biology* *69*, 522–530.
- Lauder, R.M. (2009). Chondroitin sulphate: A complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. *Complementary Therapies in Medicine* *17*, 56–62.
- Lawrence, R., Yabe, T., Hajmohammadi, S., Rhodes, J., Mcneely, M., Liu, J., Lamperti, E., Toselli, P., Lech, M., and Spear, P. (2007). The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues☆. *Matrix Biology* *26*, 442–455.
- Lawson, J.H., Butenas, S., Ribarik, N., and Mann, K.G. (1993). Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. *Journal of Biological Chemistry* *268*, 767–770.
- Le Merrer, M., Legeai-Mallet, L., Jeannin, P.M., Horsthemke, B., Schlunzel, A., Plauchu, H., Toutain, A., Achard, F., Munnich, A., and Maroteaux, P. (1994). A gene for hereditary multiple exostoses maps to chromosome 19p. *Human Molecular Genetics* *3*, 717–722.
- Léculier, C., Couprie, N., Adeleine, P., Leitiene, P., Francina, A., and Richard, M. (1993) The effects of high molecular weight- and low molecular weight-heparins on superoxide ion production and degranulation by human polymorphonuclear leukocytes. *Thrombosis Research* *69*, 519–531.
- Leder, I.G. (1980). A novel 3-*O*-sulfatase from human urine acting on methyl-2-deoxy-2-sulfamino- α -D-glucopyranoside 3-sulfate. *Biochemical and Biophysical research communications* *94*, 1183–1189.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 42732–42741.
- Lee, J.Y., and Spicer, A.P. (2000). Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology* *12*, 581–586.
- Lee, T.-Y., Folkman, J., and Javaherian, K. (2010). HSPG-Binding Peptide Corresponding to the Exon 6a-Encoded Domain of VEGF Inhibits Tumor Growth by Blocking Angiogenesis in Murine Model. *PLoS ONE* *5*, e9945.
- Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., and Vale, W. (2000). Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* *404*, 411–414.
- Li, J. (2010). Glucuronyl C5-Epimerase. An enzyme converting glucuronic acid to iduronic acid in heparan sulfate/heparin biosynthesis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* *93*, 59–78.
- Li, J., Fang, J., Qin, Y., Liao, W., Liu, H., Zhou, Y., and Ding, K. (2014). GLCE regulates PC12 cell neurogenesis induced by nerve growth factor through activating SMAD/ID3 signalling. *Biochemical Journal* *459*, 405–415.
- Li, J.-P., Galvis, M.L.E., Gong, F., Zhang, X., Zcharia, E., Metzger, S., Vlodavsky, I., Kisilevsky, R., and Lindahl, U. (2005). *In vivo* fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 6473–6477.
- Li, J.-P., Gong, F., Hagner-McWhirter, Å., Forsberg, E., Åbrink, M., Kisilevsky, R., Zhang, X., and Lindahl, U. (2003). Targeted Disruption of a Murine Glucuronyl C5-epimerase Gene Results in Heparan Sulfate Lacking I-Iduronic Acid and in Neonatal Lethality. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 28363–28366.
- Li, L., Zhang, Y., Zhou, L., Ke, M., Chen, J., Fu, X., Ye, C., Wu, J., Liu, R., and Huang, W. (2013). Antitumor efficacy of a recombinant adenovirus encoding endostatin combined with an

- E1B55KD-deficient adenovirus in gastric cancer cells. *Journal of Translational Medicine* *11*, 257.
- Li, Q., Park, P.W., Wilson, C.L., and Parks, W.C. (2002). Matrilysin Shedding of Syndecan-1 Regulates Chemokine Mobilization and Transepithelial Efflux of Neutrophils in Acute Lung Injury. *Cell* *111*, 635–646.
- Li, T., Kang, G., Wang, T., and Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncology Letters* *16*, 687–702.
- Liang, K., Liu, Q., Li, P., Han, Y., Bian, X., Tang, Y., and Kong, Q. (2018). Endostatin gene therapy delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* in murine tumor models. *Cancer Gene Therapy*.
- Lichtenberger, B.M., Tan, P.K., Niederleithner, H., Ferrara, N., Petzelbauer, P., and Sibilio, M. (2010). Autocrine VEGF Signaling Synergizes with EGFR in Tumor Cells to Promote Epithelial Cancer Development. *Cell* *140*, 268–279.
- Lin, L., McCroskery, S., Ross, J.M., Chak, Y., Neuhuber, B., and Daniels, M.P. (2010). Induction of filopodia-like protrusions by transmembrane agrin: Role of agrin glycosaminoglycan chains and Rho-family GTPases. *Experimental Cell Research* *316*, 2260–2277.
- Lin, S.J., Hu, Y., Zhu, J., Woodruff, T.K., and Jardetzky, T.S. (2011). Structure of betaglycan zona pellucida (ZP)-C domain provides insights into ZP-mediated protein polymerization and TGF- β binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *29*, 5232–5236.
- Lin, X., and Perrimon, N. (1999). Dally cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature* *400*, 281–284.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 26265–26268.
- Lindahl, U., Backstrom, G., and Thunberg, L. (1983). The antithrombin-binding sequence of heparin – Identification of an essential 6-*O*-sulfate group. *Journal of Biological Chemistry* *258*, 9826–9830.
- Lindahl, U., Backstrom, G., Höök, M., Thunberg, L., Fransson, L.A., and Linker, A. (1979). Structure of the antithrombin-binding site in heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *76*, 3198–320.
- Lindahl, U., Backstrom, G., Thunberg, L., and Leder, I.G. (1980). Evidence for a 3-*O*-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *77*, 6551–6555.
- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (1998). Regulated Diversity of Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 24979–24982.
- Ling, Y., Yang, Y., Lu, N., You, Q., Wang, S., Gao, Y., Chen, Y., and Guo, Q.-L. (2007). Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect *via* blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *361*, 79–84.
- Liu, J. (2002). Characterization of a Heparan Sulfate Octasaccharide That Binds to Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein D. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 33456–33467.
- Liu, J., and Pedersen, L.C. (2007). Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* *74*, 263–272.
- Liu, J., Shriver, Z., Blaiklock, P., Yoshida, K., Sasisekharan, R., and Rosenberg, R.D. (1999b). Heparan Sulfate d-Glucosaminyl 3-*O*-Sulfotransferase-3A Sulfates *N*-Unsubstituted Glucosamine Residues. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 38155–38162.
- Liu, J., Shworak, N.W., Sinay, P., Schwartz, J.J., Zhang, L., Fritze, L.M.S., and Rosenberg, R.D. (1999a). Expression of Heparan Sulfate d-Glucosaminyl 3-*O*-Sulfotransferase Isoforms Reveals Novel Substrate Specificities. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 5185–5192.

- Liu, J., Shworak, N.W., Sinay, P., Schwartz, J.J., Zhang, L., Fritze, L.M.S., and Rosenberg, R.D. (1999). Expression of Heparan Sulfate d-Glucosaminyl 3-*O*-Sulfotransferase Isoforms Reveals Novel Substrate Specificities. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 5185–5192.
- Liu, R., Zhou, L., Zhang, Y., Huang, B., Ke, M., Chen, J., Li, L., Fu, X., Wu, J., and Huang, W. (2013). An oncolytic adenovirus enhances antiangiogenic and antitumoral effects of a replication-deficient adenovirus encoding endostatin by rescuing its selective replication in nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *442*, 171–176.
- Lo Sasso, G., Bovenga, F., Murzilli, S., Salvatore, L., Di Tullio, G., Martelli, N., D’Orazio, A., Rainaldi, S., Vacca, M., Mangia, A., *et al.* (2013). Liver X Receptors Inhibit Proliferation of Human Colorectal Cancer Cells and Growth of Intestinal Tumors in Mice. *Gastroenterology* *144*, 1497–1507.
- Longley, R.L., Woods, A., Fleetwood, A., Cowling G.J., Gallagher, J.T., and Chouchman, J.R. (1999). Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *Journal of Cell Science* *112*, 3421–3431.
- Lopez-casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J.L., Lane, W.S., and Massagué, J. (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* *67*, 785–795.
- Lortat-Jacob, H., Turnbull, J.E., and Grimaud, J.A. (1995). Molecular organization of the interferon γ -binding domain in heparan sulphate. *Biochemical Journal* *310*, 497–505.
- Lu, J., Auduong, L., White, E.S., and Yue, X. (2013). Upregulation of Heparan Sulfate 6-*O*-Sulfation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* *50*, 106–114.
- Luan, Q., Sun, J., Li, C., Zhang, G., Lv, Y., Wang, G., Li, C., Ma, C., and Gao, T. (2011). Mutual enhancement between heparanase and vascular endothelial growth factor: A novel mechanism for melanoma progression. *Cancer Letters* *308*, 100–111.
- Lundin, L., Larsson, H., Kreuger, J., Kanda, S., Lindahl, U., Salmivirta, M., and Claesson-Welsh, L. (2000). Selectively Desulfated Heparin Inhibits Fibroblast Growth Factor-induced Mitogenicity and Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 24653–24660.
- Luo, Y., Ye, S., Kan, M., and McKeenan, W.L. (2006). Structural specificity in a FGF7-affinity purified heparin octasaccharide required for formation of a complex with FGF7 and FGFR2IIIb. *Journal of Cellular Biochemistry* *97*, 1241–1258.
- Lyon M., and Gallagher, J.T. (1998). Bio-Specific Sequences and Domains in Heparan Sulphate and the Regulation of Cell Growth and Adhesion. *Matrix Biology* *17*, 485–493.
- MacArthur, J.M., Bishop, J.R., Stanford, K.I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J.L., and Esko, J.D. (2007). Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *Journal of Clinical Investigation* *117*, 153–164.
- Maccarana, M., Sakura, Y., Tawada, A., Yoshida, K., and Lindahl, U. (1996). Domain Structure of Heparan Sulfates from Bovine Organs. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 17804–17810.
- Mader, C.C., Oser, M., Magalhaes, M.A.O., Bravo-Cordero, J.J., Condeelis, J., Koleske, A.J., and Gil-Henn, H. (2011). An EGFR-Src-Arg-Cortactin Pathway Mediates Functional Maturation of Invadopodia and Breast Cancer Cell Invasion. *Cancer Research* *71*, 1730–1741.
- Maeda, T., Desouky, J., and Friedl, A. (2006). Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth *in vivo* and stimulates tumor angiogenesis. *Oncogene* *25*, 1408–1412.
- Mahalingam, Y., Gallagher, J.T., and Couchman, J.R. (2007). Cellular Adhesion Responses to the Heparin-binding (HepII) Domain of Fibronectin Require Heparan Sulfate with Specific Properties. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 3221–3230.

- Mahapatra, S., Klee, E.W., Young, C.Y.F., Sun, Z., Jimenez, R.E., Klee, G.G., Tindall, D.J., and Donkena, K.V. (2012). Global Methylation Profiling for Risk Prediction of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* *18*, 2882–2895.
- Malinauskas, T., Janssen, B.J.C., Weir, G.A., Cader, M.Z., Siebold, C., and Jones, E.Y. (2013). Neuropilins Lock Secreted Semaphorins onto Plexins in a Ternary Signalling Complex. *Biophysical Journal* *104*, 613a.
- Malmström, A., Bartolini, B., Thelin, M.A., and Pacheco, B. (2012). Iduronic Acid in Chondroitin/Dermatan Sulfate: Biosynthesis and Biological Function. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* *60*, 916–925.
- Mansouri, R., Haÿ, E., Marie, P.J., and Modrowski, D. (2015). Role of syndecan-2 in osteoblast biology and pathology. *Bonekey Reports* *4*.
- 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*, 5043–5055.
- Marcum, J.A., Atha, D.H., Fritze, L.M., Nawroth, P., Stern, D., and Rosenberg, R.D. (1986). Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry* *261*, 7507–7517.
- Margalit, H., Fischer, N., and Ben-Sasson, S.A. (1993). Comparative Analysis of Structurally Defined Heparin Binding Sequence Reveals a Distinct Spatial Distribution of Basic Residues. *Journal of Biological Chemistry* *268*, 19228–19231.
- 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.
- Martinez, P., Vergoten, G., Colomb, F., Bobowski, M., Steenackers, A., Carpentier, M., Allain, F., Delannoy, P., and Julien, S. (2013). Over-sulfated glycosaminoglycans are alternative selectin ligands: insights into molecular interactions and possible role in breast cancer metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* *30*, 919–931.
- Martin-Subero, J.I., Ammerpohl, O., Bibikova, M., Wickham-Garcia, E., Agirre, X., Alvarez, S., Brüggemann, M., Bug, S., Calasanz, M.J., Deckert, M., *et al.* (2009). A Comprehensive Microarray-Based DNA Methylation Study of 367 Hematological Neoplasms. *PLoS ONE* *4*, e6986.
- Matkar, P.N., Jong, E.D., Ariyagunaratnam, R., Prud'homme, G.J., Singh, K.K., and Leong-Poi, H. (2018). Jack of many trades: Multifaceted role of neuropilins in pancreatic cancer. *Cancer Medicine*.
- Matsuda, K., Maruyama, H., Guo, F., Kleeff, J., Itakura, J., Matsumoto, Y., Lander, A.D., and Korc, M. (2001). Glypican-1 Is Overexpressed in Human Breast Cancer and Modulates the Mitogenic Effects of Multiple Heparin-binding Growth Factors in Breast Cancer Cells. *Cancer Research* *61*, 5562–5569.
- Matsushita, A., Gotze, T., and Korc, M. (2007). Hepatocyte Growth Factor Mediated Cell Invasion in Pancreatic Cancer Cells Is Dependent on Neuropilin-1. *Cancer Research* *67*, 10309–10316.
- Matsuura, H., Momota, Y., Murata, K., Matsushima, H., Shinkai, H., Utani, A., Suzuki, N., and Nomizu, M. (2004). Localization of the Laminin $\alpha 4$ Chain in the Skin and Identification of a Heparin-Dependent Cell Adhesion Site Within the Laminin $\alpha 4$ Chain C-Terminal LG4 Module. *Journal of Investigative Dermatology* *122*, 614–620.
- Maxhimer, J.B., Quiros, R.M., Stewart, R., Dowlatshahi, K., Gattuso, P., Fan, M., Prinz, R.A., and Xu, X. (2002). Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer. *Surgery* *132*, 326–333.
- McCarthy, K.J. (2015). The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: something old, something new. *Current Topics in Membranes* *76*, 255–303.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 668–673.
- McCormick, C., Leduc, Y., Martindale, D., Mattison, K., Esford, L., Dyer, A., and Tufaro, F. (1998). The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nature Genetics* *19*, 158–161.
- McKeehan, W.L., Wu, X., and Kan, M. (1999). Requirement for Anticoagulant Heparan Sulfate in the Fibroblast Growth Factor Receptor Complex. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 21511–21514.
- McQuade, K.J. (2006). Syndecan-1 regulates v5 integrin activity in B82L fibroblasts. *Journal of Cell Science* *119*, 2445–2456.
- Meen, A.J., Øynebråten, I., Reine, T.M., Duelli, A., Svennevig, K., Pejler, G., Jensen, T., and Kolset, S.O. (2011). Serglycin Is a Major Proteoglycan in Polarized Human Endothelial Cells and Is Implicated in the Secretion of the Chemokine GRO α /CXCL1. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 2636–2647.
- Meirson, T., and Gil-Henn, H. (2018a). Targeting invadopodia for blocking breast cancer metastasis. *Drug Resistance Updates* *39*, 1–17.
- Meirson, T., Genna, A., Lukic, N., Makhnii, T., Alter, J., Sharma, V.P., Wang, Y., Samson, A.O., Condeelis, J.S., and Gil-Henn, H. (2018b). Targeting invadopodia-mediated breast cancer metastasis by using ABL kinase inhibitors. *Oncotarget* *9*.
- 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- δ and p44/42 mitogen-activated protein kinases. *Experimental Cell Research* *314*, 616–628.
- Melrose, J., Smith, S., and Whitelock, J. (2004). Perlecan Immunolocalizes to Perichondrial Vessels and Canals in Human Fetal Cartilaginous Primordia in Early Vascular and Matrix Remodeling Events Associated with Diarthrodial Joint Development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* *52*, 1405–1413.
- Mendes-da-Cruz, D.A., Lepelletier, Y., Brignier, A.C., Smaniotto, S., Renand, A., Milpied, P., Dardenne, M., Hermine, O., and Savino, W. (2009). Neuropilins, Semaphorins, and Their Role in Thymocyte Development. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1153*, 20–28.
- Mennerich, D., Vogel, A., Klamann, I., Dahl, E., Lichtner, R.B., Rosenthal, A., Pohlenz, H.-D., Thierauch, K.-H., and Sommer, A. (2004). Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. *European Journal of Cancer* *40*, 1373–1382.
- Menter, D.G., Tucker, S.C., Kopetz, S., Sood, A.K., Crissman, J.D., and Honn, K.V. (2014). Platelets and cancer: a casual or causal relationship: revisited. *Cancer and Metastasis Reviews* *33*, 231–269.
- Merry, C.L.R., Lyon, M., Deakin, J.A., Hopwood, J.J., and Gallagher, J.T. (1999). Highly Sensitive Sequencing of the Sulfated Domains of Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 18455–18462.
- Meyer, K., and Palmer, J.W. (1934). The polysaccharide of vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry* *107*, 629–634.
- Meyer, K., Linker, A., Davidson, E.A., and Weissmann, B. (1953). The mucopolysaccharides of bovine corneal. *Journal of Biological Chemistry* *205*, 611–616.
- Miao, H.-Q., Lee, P., Lin, H., Soker, S., and Klagsbrun, M. (2000). Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *The FASEB Journal* *14*, 2532–2539.

- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., and Rot, A. (1997). Transcytosis and Surface Presentation of IL-8 by Venular Endothelial Cells. *Cell* *91*, 385–395.
- Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1830*, 4719–4733.
- Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1830*, 4719–4733.
- Mikhailov, D., Linhardt, J.R., and Mayo, H.K. (1997). NMR solution conformation of heparin-derived hexasaccharide. *Biochemical Journal* *328*, 51–61.
- Mikhailov, D., Mayo, K.H., Vlahov, I.R., Toida, T., Pervin, A., and Linhardt, R.J. (1996). NMR solution conformation of heparin-derived tetrasaccharide. *Biochemical Journal* *318*, 93–102.
- Mishra-Gorur, K., and Castellot, J.J. (1999). Heparin rapidly and selectively regulates protein tyrosine phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology* *178*, 205–215.
- Mitselou, A., Skoufi, U., Tsimogiannis, K.E., Briasoulis, E., Vougiouklakis, T., Arvanitis, D., and Ioachim, E. (2012). Association of Syndecan-1 with Angiogenesis-related Markers, Extracellular Matrix Components, and Clinicopathological Features in Colorectal Carcinoma. *Anticancer Research* *32*, 3977–3985.
- Mitsi, M., Forsten-Williams, K., Gopalakrishnan, M., and Nugent, M.A. (2008). A Catalytic Role of Heparin within the Extracellular Matrix. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 34796–34807.
- Mitsi, M., Hong, Z., Costello, C.E., and Nugent, M.A. (2006). Heparin-Mediated Conformational Changes in Fibronectin Expose Vascular Endothelial Growth Factor Binding Sites. *Biochemistry* *45*, 10319–10328.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., and Koutsilieris, M. (2004). The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Current Cancer Drug Targets* *4*, 235–256.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 26780–26787.
- Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y., and Kimata, K. (2008). Tetrasulfated Disaccharide Unit in Heparan Sulfate: Enzymatic Formation and Tissue Distribution. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 31237–31245.
- Montalbano, M., Georgiadis, J., Masterson, A.L., McGuire, J.T., Prajapati, J., Shirafkan, A., Rastellini, C., and Cicalese, L. (2017). Biology and function of glypican-3 as a candidate for early cancerous transformation of hepatocytes in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports* *37*, 1291–1300.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 45185–45193.
- Moon, A.F., Xu, Y., Woody, S.M., Krahn, J.M., Linhardt, R.J., Liu, J., and Pedersen, L.C. (2012). Dissecting the substrate recognition of 3-*O*-sulfotransferase for the biosynthesis of anticoagulant heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 5265–5270.

- Morii, E. (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. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 49175–49185.
- Morio, H., Honda, Y., Toyoda, H., Nakajima, M., Kurosawa, H., and Shirasawa, T. (2003). EXT gene family member rib-2 is essential for embryonic development and heparan sulfate biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *301*, 317–323.
- 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.
- Mousa, S.A., and Mohamed, S. (2004). Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis* *92*, 627–633.
- Mukunyadzi, P., Liu, K., Hanna, E.Y., Suen, J.Y., and Fan, C.-Y. (2003). Induced Expression of Syndecan-1 in the Stroma of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Modern Pathology* *16*, 796–801.
- Mulloy, B., and Forster, M.J. (2000). Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology* *10*, 1147–1156.
- Mundhenke, C., Thomas, J.P., Wilding, G., Lee, F.T., Kelzc, F., Chappell, R., Neider, R., Sebree, L.A., and Friedl, A. (2001). Tissue Examination to Monitor Antiangiogenic Therapy: A Phase I Clinical Trial with Endostatin. *Clinical Cancer Research* *7*, 3366–3374.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *288*, 9321–9333.
- Nagai, N. (2004). Stem domains of heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferase are required for Golgi localization, oligomer formation and enzyme activity. *Journal of Cell Science* *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 β -Secretase Activity. *Journal of Biological Chemistry* *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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *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. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 9579–9590.
- Nagarajan, A., Malvi, P., and Wajapeyee, N. (2018). Heparan sulfate and heparan sulfate proteoglycans in cancer initiation and progression. *Frontiers in Endocrinology* *9*.
- Naggi, A., Casu, B., Perez, M., Torri, G., Cassinelli, G., Penco, S., Pisano, C., Giannini, G., Ishai-Michaeli, R., and Vlodavsky, I. (2005). Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfation, Graded *N*-Acetylation, and Glycol Splitting. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 12103–12113.
- Nakajima, M., Irimura, T., and Nicolson, G.L. (1988). Heparanases and tumor metastasis. *Journal of Cellular Biochemistry* *36*, 157–167.

- Nam, E.J., and Park, P.W. (2012). Shedding of Cell Membrane-Bound Proteoglycans. *Methods in Molecular Biology* *836*, 291–305.
- 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, N.T., Vivès, R.R., Torres, M., Delauzun, V., Saesen, E., Roig-Zamboni, V., Lortat-Jacob, H., Rihet, P., and Bourne, Y. (2018). Genetic and enzymatic characterization of 3-*O*-sulfotransferase SNPs associated with *Plasmodium falciparum* parasitaemia. *Glycobiology* *28*, 534–541.
- 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.
- Niemann, C.U., Kjeldsen, L., Ralfkiaer, E., Jensen, M.K., and Borregaard, N. (2007). Serglycin proteoglycan in hematologic malignancies: a marker of acute myeloid leukemia. *Leukemia* *21*, 2406–2410.
- Niers, T.M.H., Klerk, C.P.W., DiNisio, M., Van Noorden, C.J.F., Büller, H.R., Reitsma, P.H., and Richel, D.J. (2007). Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* *61*, 195–207.
- Nikitovic, D., Mytilinaiou, M., Berdiaki, A., Karamanos, N.K., and Tzanakakis, G.N. (2014). Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1840*, 2471–2481.
- Nilsson, T., and Warren, G. (1994). Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology* *6*, 517–521.
- Norgard-Sumnicht, K., Varki, N., and Varki, A. (1993). Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science* *261*, 480–483.
- 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'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* *88*, 277–285.
- Oh, E.S., and Couchman, J.R. (2004). Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Molecules and Cells* *17*, 181–187.
- Okina, E., Manon-Jensen, T., Whiteford, J.R., and Couchman, J.R. (2009). Syndecan proteoglycan contributions to cytoskeletal organization and contractility. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* *19*, 479–489.
- Olson, S.T., Halvorson, H.R., and Björk, I. Quantitative Characterization of the Thrombin-Heparin Interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models. *Journal of Biological Chemistry* *266*, 6342–6352.
- Ori, A., Wilkinson, M.C., and Fernig, D.G. (2011). A Systems Biology Approach for the Investigation of the Heparin/Heparan Sulfate Interactome. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 19892–19904.
- Ostapoff, K.T., Awasthi, N., Kutluk Cenik, B., Hinz, S., Dredge, K., Schwarz, R.E., and Brekken, R.A. (2013). PG545, an Angiogenesis and Heparanase Inhibitor, Reduces Primary Tumor Growth and Metastasis in Experimental Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* *12*, 1190–1201.
- Ottlingert, M.E., Pukac, L.A., and Karnovsky, M.J. (1993). Heparin Inhibits Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Intact Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* *268*, 19173–19176.

- 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.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 16885–16894.
- Palumbo, J.S. (2005). Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* *105*, 178–185.
- Pang, H.-B., Braun, G.B., and Ruoslahti, E. (2015). Neuropilin-1 and heparan sulfate proteoglycans cooperate in cellular uptake of nanoparticles functionalized by cationic cell-penetrating peptides. *Science Advances* *1*, e1500821–e1500821.
- Pap, T., and Bertrand, J. (2013). Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nature Reviews Rheumatology* *9*, 43–55.
- Parish, C.R. (2006). The role of heparan sulphate in inflammation. *Nature Reviews Immunology* *6*, 633–643.
- Parish, C.R., Freeman, C., Brown, K.J., Francis, D.J., and Cowden, W.B. (1999). Identification of Sulfated Oligosaccharide-based Inhibitors of Tumor Growth and Metastasis Using Novel *in Vitro* Assays for Angiogenesis and Heparanase Activity. *Cancer Research* *59*, 3433–3441.
- Park, P.W., Pier, G.B., Hinkes, M.T., and Bernfield, M. (2001). Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* *411*, 98–102.
- Park, P.W., Pier, G.B., Preston, M.J., Goldberger, O., Fitzgerald, M.L., and Bernfield, M. (2000). Syndecan-1 Shedding Is Enhanced by LasA, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 3057–3064.
- Parrish, R.F., and Fair, W.R. (1981). Selective binding of zinc ions to heparin rather than to other glycosaminoglycans. *Biochemical Journal* *193*, 407–410.
- Paulick, M.G., and Bertozzi, C.R. (2008). The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry* *47*, 6991–7000.
- Payne, C.K., Jones, S.A., Chen, C., and Zhuang, X. (2007). Internalization and Trafficking of Cell Surface Proteoglycans and Proteoglycan-Binding Ligands. *Traffic* *8*, 389–401.
- 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 α 1,4- *N*- Acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a Member of the Exostosin Gene Family Involved in Heparan Sulfate Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 14420–14428.
- Pejler, G., Åbrink, M., and Wernersson, S. (2009). Serglycin proteoglycan: Regulating the storage and activities of hematopoietic proteases. *BioFactors* *35*, 61–68.
- Pejler, G., Danielsson, A., Bjork, I., Lindahl, U., Nader, H.B., and Dietrich, C. (1987). Structure and Antithrombin-binding Properties of Heparin Isolated from the Clams *Anomalocardia brasiliensis* and *Tivela mactroides*. *Journal of Biological Chemistry* *262*, 11413–11421.
- Pejler, G., Lindahl, U., Paulsson, S. M., Dziadek, M., Fujiwarall, S., and Timpl, R. (1987). Structure and Affinity for Antithrombin of Heparan Sulfate Chains Derived from Basement Membrane Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* *262*, 5036–5043.
- Pellegrini, L., Burke, D.F., and Blundell, T.L. (2000). Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* *407*, 1029–1034.
- Pempe, E.H., Xu, Y., Gopalakrishnan, S., Liu, J., and Harris, E.N. (2012). Probing Structural Selectivity of Synthetic Heparin Binding to Stabilin Protein Receptors. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 20774–20783.

- Peng, Y., Yu, Y., Lin, L., Liu, X., Zhang, X., Wang, P., Hoffman, P., Kim, S.Y., Zhang, F., and Linhardt, R.J. (2018). Glycosaminoglycans from bovine eye vitreous humour and interaction with collagen type II. *Glycoconjugate Journal* *35*, 119–128.
- Peterson, S., Frick, A., and Liu, J. (2009). Design of biologically active heparan sulfate and heparin using an enzyme-based approach. *Natural Product Reports* *26*, 610.
- Petrey, A.C., and de la Motte, C.A. (2014). Hyaluronan, a Crucial Regulator of Inflammation. *Frontiers in Immunology* *5*.
- 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.S., Smith, B., Olson, S., Aikawa, J. -i., Kimata, K., and Esko, J.D. (2001). Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: Uronosyl 5-epimerase and 2-*O*-sulfotransferase interact in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 12984–12989.
- Pisano, C., Aulicino, C., Vesci, L., Casu, B., Naggi, A., Torri, G., Ribatti, D., Belleri, M., Rusnati, M., and Presta, M. (2004). Undersulfated, low-molecular-weight glycol-split heparin as an antiangiogenic VEGF antagonist. *Glycobiology* *15*, 1C-6C.
- Pomin, V.H. (2015). Keratan sulfate: An up-to-date review. *International Journal of Biological Macromolecules* *72*, 282–289.
- Pomin, V.H. (2016). Paradigms in the structural biology of the mitogenic ternary complex FGF:FGFR:heparin. *Biochimie* *127*, 214–226.
- Poulain, F.E., and Yost, H.J. (2015). Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development? *Development* *142*, 3456–3467.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology* *5*, 5–23.
- 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 Chemical Biology* *10*, 1064–1071.
- Presto, J., Thuveson, M., Carlsson, P., Busse, M., Wilen, M., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., and Kjellen, L. (2008). Heparan sulfate biosynthesis enzymes EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 4751–4756.
- 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. *European Journal of Neuroscience* *27*, 593–604.
- Proudfoot, A., Johnson, Z., Bonvin, P., and Handel, T. (2017). Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System. *Pharmaceuticals* *10*, 70.
- Proudfoot, A.E.I., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N.C., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the *in vivo* activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 1885–1890.
- Prud'homme, G.J., and Glinka, Y. (2012). Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* *3*.
- Prud'homme, G.J., and Glinka, Y. (2012). Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* *3*.
- Prudnikova, T.Y., Mostovich, L.A., Domanitskaya, N.V., Pavlova, T.V., Kashuba, V.I., Zabarovsky, E.R., and Grigorieva, E.V. (2010). Antiproliferative effect of D-glucuronyl C₅-epimerase in human breast cancer cells. *Cancer Cell International* *10*, 27.

- 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.
- Purushothaman, A., and Toole, B.P. (2014). Serglycin Proteoglycan Is Required for Multiple Myeloma Cell Adhesion, *in Vivo* Growth, and Vascularization. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 5499–5509.
- Pye, D.A., Vives, R.R., Turnbull, J.E., Hyde, P., and Gallagher, J.T. (1998). Heparan Sulfate Oligosaccharides Require 6-*O*-Sulfation for Promotion of Basic Fibroblast Growth Factor Mitogenic Activity. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 22936–22942.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *290*, 4620–4630.
- Quantock, A.J., Young, R.D., and Akama, T.O. (2010). Structural and biochemical aspects of keratan sulphate in the cornea. *Cellular and Molecular Life Sciences* *67*, 891–906.
- Raats, C.J.I., Van Den Born, J., and Berden, J.H.M. (2000). Glomerular heparan sulfate alterations: Mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney International* *57*, 385–400.
- Raimondi, C., and Ruhrberg, C. (2013). Neuropilin signalling in vessels, neurons and tumours. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *24*, 172–178.
- Raman, K., and Kuberan, B. (2010). Chemical Tumor Biology of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Current Chemical Biology* *4*, 20–31.
- Ramani, V.C., Yang, Y., Ren, Y., Nan, L., and Sanderson, R.D. (2011). Heparanase Plays a Dual Role in Driving Hepatocyte Growth Factor (HGF) Signaling by Enhancing HGF Expression and Activity. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 6490–6499.
- Ramos-García, P., González-Moles, M.Á., González-Ruiz, L., Ayén, Á., Ruiz-Ávila, I., Navarro-Triviño, F.J., and Gil-Montoya, J.A. (2018). An update of knowledge on cortactin as a metastatic driver and potential therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases*.
- Rao, L.V.M., Nordfang, O., and Pendurthi, R. Mechanism of Antithrombin I11 Inhibition of Factor VIIa/Tissue Factor Activity on Cell Surfaces. Comparison With Tissue Factor Pathway Inhibited Factor Xa-Induced Inhibition of Factor VIIa/Tissue Factor Activity. *85*, 121–129.
- Reizes, O., Benoit, S.C., Strader, A.D., Clegg, D.J., Akunuru, S., and Seeley, R.J. (2003). Syndecan-3 Modulates Food Intake by Interacting with the Melanocortin/AgRP Pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* *994*, 66–73.
- Ren, Z.-X., Yu, H.-B., Li, J.-S., Shen, J.-L., and Du, W.-S. (2015). Suitable parameter choice on quantitative morphology of A549 cell in epithelial-mesenchymal transition. *Bioscience Reports* *35*.
- Richard, B., Swanson, R., and Olson, S.T. (2009). The Signature 3-*O*-Sulfo Group of the Anticoagulant Heparin Sequence Is Critical for Heparin Binding to Antithrombin but Is Not Required for Allosteric Activation. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 27054–27064.
- Ringvall, M., and Kjellén, L. (2010). Mice Deficient in Heparan Sulfate N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 1. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 35–58.
- Ringvall, M., Ledin, J., Holmborn, K., van Kuppevelt, T., Ellin, F., Eriksson, I., Olofsson, A.-M., Kjellén, L., and Forsberg, E. (2000). Defective Heparan Sulfate Biosynthesis and Neonatal Lethality in Mice Lacking N-Deacetylase/N-Sulfotransferase-1. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 25926–25930.
- Rinkenbaugh, A., and Baldwin, A. (2016). The NF-κB Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells* *5*, 16.
- Ritchie, J.P., Ramani, V.C., Ren, Y., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., Penco, S., Pisano, C., Carminati, P., Tortoreto, M., *et al.* (2011). SST0001, a Chemically Modified Heparin, Inhibits Myeloma

- Growth and Angiogenesis *via* Disruption of the Heparanase/Syndecan-1 Axis. *Clinical Cancer Research* *17*, 1382–1393.
- Rizzolio, S., Rabinowicz, N., Rainero, E., Lanzetti, L., Serini, G., Norman, J., Neufeld, G., and Tamagnone, L. (2012). Neuropilin-1-Dependent Regulation of EGF-Receptor Signaling. *Cancer Research* *72*, 5801–5811.
- 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. *6*.
- 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.
- Roy, M., and Marchetti, D. (2009). Cell surface heparan sulfate released by heparanase promotes melanoma cell migration and angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* *106*, 200–209.
- Sadir, R., Imberty, A., Baleux, F., and Lortat-Jacob, H. (2004). Heparan Sulfate/Heparin Oligosaccharides Protect Stromal Cell-derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against Proteolysis Induced by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 43854–43860.
- Salimath, P.V., Spiro, R.C., and Freeze, H.H. (1995). Identification of a novel glycosaminoglycan core-like molecule. *Journal of Biological Chemistry* *270*, 9164–9168.
- 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 Biology* *11*, e1001727.
- San Antonio, J.D. (1994). Mapping the heparin-binding sites on type I collagen monomers and fibrils. *The Journal of Cell Biology* *125*, 1179–1188.
- Sánchez-Bailón, M.P., Calcabrini, A., Gómez-Domínguez, D., Morte, B., Martín-Forero, E., Gómez-López, G., Molinari, A., Wagner, K.-U., and Martín-Pérez, J. (2012). Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cellular Signalling* *24*, 1276–1286.
- Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J.K., Mosher, D.F., Robinson, S.D., Hynes, R.O., and Goetinck, P.F. (1999). Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rhoddependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 2805–2810.
- Sarabipour, S., and Mac Gabhann, F. (2018). VEGF-A121a binding to Neuropilins – A concept revisited. *Cell Adhesion & Migration* *12*, 204–214.
- Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *3*, a004952–a004952.
- Sasisekharan, R. (2000). Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Current Opinion in Chemical Biology* *4*, 626–631.
- Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G., and Narayanasami, U. (2002). Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nature Reviews Cancer* *2*, 521–528.
- Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G., and Narayanasami, U. (2002). Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nature Reviews Cancer* *2*, 521–528.
- Sawant, K.V., Poluri, K.M., Dutta, A.K., Sepuru, K.M., Troshkina, A., Garofalo, R.P., and Rajarathnam, K. (2016). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports* *6*.
- Schick, B.P. (2010). Serglycin Proteoglycan Deletion in Mouse Platelets: physiological effects and their implications for platelet contributions to thrombosis, inflammation, atherosclerosis, and metastasis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* *93*, 235–287.
- Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J., and Mohammadi, M. (2000). Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex

- Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization. *Molecular Cell* *6*, 743–750.
- Schnoor, M., Stradal, T.E., and Rottner, K. (2018). Cortactin: Cell Functions of A Multifaceted Actin-Binding Protein. *Trends in Cell Biology* *28*, 79–98.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *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. *The American Journal of Pathology* *174*, 979–988.
- Schuksz, M., Fuster, M.M., Brown, J.R., Crawford, B.E., Ditto, D.P., Lawrence, R., Glass, C.A., Wang, L., Tor, Y., and Esko, J.D. (2008). Surfen, a small molecule antagonist of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 13075–13080.
- Schwarzbauer, J.E., and DeSimone, D.W. (2011). Fibronectins, Their Fibrillogenesis, and *In Vivo* Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *3*, a005041–a005041.
- Scully, O.J., Chua, P.-J., Harve, K.S., Bay, B.-H., and Yip, G.W. (2012). Serglycin in Health and Diseases. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* *295*, 1415–1420.
- 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. *Developmental Dynamics* *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. *The FASEB Journal* *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 Reports* *1*, 282–286.
- Seppinen, L., and Pihlajaniemi, T. (2011). The multiple functions of collagen XVIII in development and disease. *Matrix Biology* *30*, 83–92.
- 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.
- Sertie, A.L. (2000). Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Human Molecular Genetics* *9*, 2051–2058.
- Sever, R., and Brugge, J.S. (2015). Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* *5*.
- Shao, C., Zhang, F., Kemp, M.M., Linhardt, R.J., Waisman, D.M., Head, J.F., and Seaton, B.A. (2006). Crystallographic Analysis of Calcium-dependent Heparin Binding to Annexin A2. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 31689–31695.
- Sharma, A. (1999). Crystal structure of a heparin-and integrin-binding segment of human fibronectin. *The EMBO Journal* *18*, 1468–1479.
- Sharma, B., Handler, M., Eichstetter, I., Whitelock, J.M., Nugent, M.A., and Iozzo, R.V. (1998). Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis *in vivo*. *Journal of Clinical Investigation* *102*, 1599–1608.

- Sharma, V.P., Eddy, R., Entenberg, D., Kai, M., Gertler, F.B., and Condeelis, J. (2013). Tks5 and SHIP2 Regulate Invadopodium Maturation, but Not Initiation, in Breast Carcinoma Cells. *Current Biology* *23*, 2079–2089.
- Shi, F., Shang, L., Yang, L.-Y., Jiang, Y.-Y., Wang, X.-M., Hao, J.-J., Zhang, Y., Huang, D.-K., Cai, Y., Xu, X., *et al.* (2018). Neuropilin-1 contributes to esophageal squamous cancer progression *via* promoting P65-dependent cell proliferation. *Oncogene* *37*, 935–943.
- 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 Biochimica et Biophysica Sinica* *43*, 849–856.
- Shintani, Y., Takashima, S., Asano, Y., Kato, H., Liao, Y., Yamazaki, S., Tsukamoto, O., Seguchi, O., Yamamoto, H., Fukushima, T., *et al.* (2006). Glycosaminoglycan modification of neuropilin-1 modulates VEGFR2 signaling. *The EMBO Journal* *25*, 3045–3055.
- Shivapurkar, N., Sherman, M.E., Stastny, V., Echebiri, C., Rader, J.S., Nayar, R., Bonfiglio, T.A., Gazdar, A.F., and Wang, S.S. (2007). Evaluation of candidate methylation markers to detect cervical neoplasia. *Gynecologic Oncology* *107*, 549–553.
- Shriver, Z., Capila, I., Venkataraman, G., and Sasisekharan, R. (2012). Heparin and Heparan Sulfate: Analyzing Structure and Microheterogeneity. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 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.
- Shworak, N.W., Kobayashi, T., Agostini, A. de, and Smits, N.C. (2010). Anticoagulant Heparan Sulfate: to not clot – or not? *Progress in Molecular Biology and Translational Science* *93*, 153–178.
- Shworak, N.W., Liu, J., Fritze, L.M.S., Schwartz, J.J., Zhang, L., Logeart, D., and Rosenberg, R.D. (1997). Molecular Cloning and Expression of Mouse and Human cDNAs Encoding Heparan Sulfate d-Glucosaminyl 3-*O*-Sulfotransferase. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 28008–28019.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 5170–5184.
- Sikora, A.-S., Delos, M., Martinez, P., Carpentier, M., Allain, F., and Denys, A. (2016a). Regulation of the Expression of Heparan Sulfate 3-*O*-Sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by Inflammatory Stimuli in Human Monocytes: Regulation Of HS3ST3B by Inflammatory Stimuli. *Journal of Cellular Biochemistry* *117*, 1529–1542.
- Sikora, A.-S., Hellec, C., Carpentier, M., Martinez, P., Delos, M., Denys, A., and Allain, F. (2016b). Tumour-necrosis factor- α induces heparan sulfate 6-*O*-endosulfatase 1 (Sulf-1) expression in fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *80*, 57–65.
- Singh, P., Blatt, A., Feld, S., Zohar, Y., Saadi, E., Barki-Harrington, L., Hammond, E., Ilan, N., Vlodavsky, I., Chowers, Y., *et al.* (2017). The Heparanase Inhibitor PG545 Attenuates Colon Cancer Initiation and Growth, Associating with Increased p21 Expression. *Neoplasia* *19*, 175–184.
- 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. *Circulation Research* *107*, 1336–1344.
- Smeds, E., Feta, A., and Kusche-Gullberg, M. (2010). Target selection of heparan sulfate hexuronic acid 2-*O*-sulfotransferase. *Glycobiology* *20*, 1274–1282.

- 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. *Biochemical Journal* *372*, 371–380.
- Smith, E.M., Mitsi, M., Nugent, M.A., and Symes, K. (2009). PDGF-A interactions with fibronectin reveal a critical role for heparan sulfate in directed cell migration during *Xenopus* gastrulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 21683–21688.
- Smorenburg, S.M. The Complex Effects of Heparins on Cancer Progression and Metastasis in Experimental Studies. *Pharmacological Review* *53*, 93–105.
- Sobel, M., Soler, D.F., Kermode, J.C., and Harris, R.B. (1992). Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* *267*, 8857–8862.
- Solomon, B.D., Mueller, C., Chae, W.-J., Alabanza, L.M., and Bynoe, M.S. (2011). Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 2040–2045.
- Solomon, L. Hereditary Multiple Exostosis. *The American Journal of Human Genetics* *16*, 351–363.
- Song, H., Liu, X., Zhang, H., Zhu, B., Yuan, S., Liu, S., and Tang, Z. (2005). Pharmacokinetics of His-tag recombinant human endostatin in Rhesus monkeys. *Acta Pharmacologica Sinica* *26*, 124–128.
- 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 Biology & Therapy* *12*, 388–398.
- Spillmann, D. (2001). Heparan sulfate: Anchor for viral intruders? *Biochimie* *83*, 811–817.
- Spillmann, D., Witt, D., and Lindahl, U. (1998). Defining the Interleukin-8-binding Domain of Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 15487–15493.
- Srinivasan, S.R., Radhakrishnamurthy, B., and Berenson, G.S. (1975). Studies on the interaction of heparin with serum lipoproteins in the presence of Ca²⁺, Mg²⁺, and Mn²⁺. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *170*, 334–340.
- Stanford, K.I., Wang, L., Castagnola, J., Song, D., Bishop, J.R., Brown, J.R., Lawrence, R., Bai, X., Habuchi, H., Tanaka, M., *et al.* (2010). Heparan Sulfate 2-*O*-Sulfotransferase Is Required for Triglyceride-rich Lipoprotein Clearance. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 286–294.
- Stenvers, K.L., Tursky, M.L., Harder, K.W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R.A., Sizeland, A.M., and Zhu, H.-J. (2003). Heart and Liver Defects and Reduced Transforming Growth Factor 2 Sensitivity in Transforming Growth Factor Type III Receptor-Deficient Embryos. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 4371–4385.
- Stepp, M.A., Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G., and Pajoohesh-Ganji, A. (2015). Syndecan-1 and Its Expanding List of Contacts. *Advances in Wound Care* *4*, 235–249.
- Stevenson, J.L., Varki, A., and Borsig, L. (2007). Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects. *Thrombosis Research* *120*, S107–S111.
- Stringer, S.E., and Gallagher, J.T. (1997). Specific Binding of the Chemokine Platelet Factor 4 to Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 20508–20514.
- Stringer, S.E., Forster, M.J., Mulloy, B., Bishop, C.R., Graham, G.J., and Gallagher, J.T. (2002). Characterization of the binding site on heparan sulfate for macrophage inflammatory protein 1. *100*, 1543–1550.
- Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.-C., Bonfiglio, T., Hicks, D.G., *et al.* (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* *4*, 117822341000400.

- Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2002). Heparin and Heparan Sulfate Biosynthesis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life* *54*, 163–175.
- Sugaya, N., Habuchi, H., Nagai, N., Ashikari-Hada, S., and Kimata, K. (2008). 6-*O*-Sulfation of Heparan Sulfate Differentially Regulates Various Fibroblast Growth Factor-dependent Signalings in Culture. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 10366–10376.
- Suhovskih, A.V., Domanitskaya, N.V., Tsidulko, A.Y., Prudnikova, T.Y., Kashuba, V.I., and Grigorieva, E.V. (2015). Tissue-specificity of heparan sulfate biosynthetic machinery in cancer. *Cell Adhesion & Migration* *9*, 452–459.
- Suzuki, O.T., Sertié, A.L., Der Kaloustian, V.M., Kok, F., Carpenter, M., Murray, J., Czeizel, A.E., Kliemann, S.E., Rosemberg, S., Monteiro, M., *et al.* (2002). Molecular Analysis of Collagen XVIII Reveals Novel Mutations, Presence of a Third Isoform, and Possible Genetic Heterogeneity in Knobloch Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* *71*, 1320–1329.
- Sweeney, S.M., Guy, C.A., Fields, G.B., and Antonio, J.D.S. (1998). Defining the domains of type I collagen involved in heparin- binding and endothelial tube formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 7275–7280.
- Symes, K., Smith, E.M., Mitsi, M., and Nugent, M.A. (2010). Sweet cues: How heparan sulfate modification of fibronectin enables growth factor guided migration of embryonic cells. *Cell Adhesion & Migration* *4*, 507–510.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *383*, 113–118.
- Tamori, Y., and Kasuga, M. (2013). Glypican-4 is a new comer of adipokines working as insulin sensitizer. *Journal of Diabetes Investigation* *4*, 250–251.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., and Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature* *361*, 79–82.
- Tang, R., and Rosen, S.D. (2009). Functional Consequences of the Subdomain Organization of the Sulfs. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 21505–21514.
- Tang, W., Nakamura, Y., Tsujimoto, M., Sato, M., Wang, X., Kurozumi, K., Nakahara, M., Nakao, K., Nakamura, M., Mori, I., *et al.* (2002). Heparanase: A Key Enzyme in Invasion and Metastasis of Gastric Carcinoma. *Modern Pathology* *15*, 593–598.
- 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*. *Genes, Genomes, Genetics* *3*, 541–552.
- Teran, M., and Nugent, M.A. (2015). Synergistic Binding of Vascular Endothelial Growth Factor-A and Its Receptors to Heparin Selectively Modulates Complex Affinity. *Journal of Biological Chemistry* *290*, 16451–16462.
- Teran, M., and Nugent, M.A. (2015). Synergistic Binding of Vascular Endothelial Growth Factor-A and Its Receptors to Heparin Selectively Modulates Complex Affinity. *Journal of Biological Chemistry* *290*, 16451–16462.
- 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 Chemical Biology* *11*, 971–980.
- 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 Biology* *35*, 60–72.
- Thelin, M.A., Bartolini, B., Axelsson, J., Gustafsson, R., Tykesson, E., Pera, E., Oldberg, Å., Maccarana, M., and Malmstrom, A. (2013). Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. *FEBS Journal* *280*, 2431–2446.

- Thieker, D.F., Xu, Y., Chapla, D., Nora, C., Qiu, H., Felix, T., Wang, L., Moremen, K.W., Liu, J., Esko, J.D., *et al.* (2018). Downstream Products are Potent Inhibitors of the Heparan Sulfate 2-*O*-Sulfotransferase. *Scientific Reports* *8*.
- Thompson, L.D., Pantoliano, M.W., and Springer, B.A. (1994). Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain. *Biochemistry* *33*, 3831–3840.
- Tímár, J., Döme, B., Fazekas, K., Janovics, Á., and Paku, S. (2001). Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathology & Oncology Research* *7*, 85–94.
- Tiwari, V. (2004). A role for 3-*O*-sulfated heparan sulfate in cell fusion induced by herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology* *85*, 805–809.
- 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. *Journal of Virology* *80*, 8970–8980.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *338*, 930–937.
- Tkachenko, E. (2004). Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed *via* syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *Journal of Cell Science* *117*, 3189–3199.
- Tkachenko, E. (2005). Syndecans: New Kids on the Signaling Block. *Circulation Research* *96*, 488–500.
- Tkachenko, E., and Simons, M. (2002). Clustering Induces Redistribution of Syndecan-4 Core Protein into Raft Membrane Domains. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 19946–19951.
- Tone, Y., Pedersen, L.C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J., Negishi, M., and Sugahara, K. (2008). 2-*O*-Phosphorylation of Xylose and 6-*O*-Sulfation of Galactose in the Protein Linkage Region of Glycosaminoglycans Influence the Glucuronyltransferase-I Activity Involved in the Linkage Region Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 16801–16807.
- Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., Hermine, O., and Roméo, P.-H. (2002). A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nature Immunology* *3*, 477–482.
- Tse, B.W.C., Volpert, M., Ratther, E., Stylianou, N., Nouri, M., McGowan, K., Lehman, M.L., McPherson, S.J., Roshan-Moniri, M., Butler, M.S., *et al.* (2017). Neuropilin-1 is upregulated in the adaptive response of prostate tumors to androgen-targeted therapies and is prognostic of metastatic progression and patient mortality. *Oncogene* *36*, 3417–3427.
- Turnbull, J., Powell, A., and Guimond, S. (2001). Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends in Cell Biology* *11*, 75–82.
- Turnbull, J.E., Fernig, D.G., Wilkinson, M.C., and Gallagher, J.T. (1992). Identification of the Basic Fibroblast Growth Factor Binding Sequence in Fibroblast Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* *267*, 10337–10341.
- Tzeng, S.-T., Tsai, M.-H., Chen, C.-L., Lee, J.-X., Jao, T.-M., Yu, S.-L., Yen, S.-J., and Yang, Y.-C. (2013). NDST4 Is a Novel Candidate Tumor Suppressor Gene at Chromosome 4q26 and Its Genetic Loss Predicts Adverse Prognosis in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* *8*, e67040.
- Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z., and Rosen, S.D. (2006). HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochemistry* *7*.

- 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. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 29134–29140.
- Uniewicz, K.A. (2008). Neuropilins: a versatile partner of extracellular molecules that regulate development and disease. *Frontiers in Bioscience* *13*, 4339–4360.
- Uniewicz, K.A., Ori, A., Ahmed, Y.A., Yates, E.A., and Fernig, D.G. (2014). Characterisation of the interaction of neuropilin-1 with heparin and a heparan sulfate mimetic library of heparin-derived sugars. *PeerJ* *2*, e461.
- Ussar, S., Bezy, O., Blucher, M., and Kahn, C.R. (2012). Glypican-4 Enhances Insulin Signaling *via* Interaction With the Insulin Receptor and Serves as a Novel Adipokine. *Diabetes* *61*, 2289–2298.
- Utani, A., Nomizu, M., Matsuura, H., Kato, K., Kobayashi, T., Takeda, U., Aota, S., Nielsen, P.K., and Shinkai, H. (2001). A Unique Sequence of the Laminin $\alpha 3$ G Domain Binds to Heparin and Promotes Cell Adhesion through Syndecan-2 and -4. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 28779–28788.
- 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 der Voort, R., Taher, T.E.I., Wielenga, V.J.M., Spaargaren, M., Prevo, R., Smit, L., David, G., Hartmann, G., Gherardi, E., and Pals, S.T. (1999). Heparan Sulfate-modified CD44 Promotes Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-induced Signal Transduction through the Receptor Tyrosine Kinase c-Met. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 6499–6506.
- van Wijk, X.M.R., and van Kuppevelt, T.H. (2013). Heparan sulfate in angiogenesis: a target for therapy. *Angiogenesis* *17*, 443–462.
- Vander Kooij, C.W., Jusino, M.A., Perman, B., Neau, D.B., Bellamy, H.D., and Leahy, D.J. (2007). Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 6152–6157.
- Vannahme, C., Schubel, S., Herud, M., Gosling, S., Hulsmann, H., Paulsson, M., Hartmann, U., and Maurer, P. (1999). Molecular Cloning of Testican-2: Defining a Novel Calcium- Binding Proteoglycan Family Expressed in Brain. *J. Neurochem.* *73*, 9.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 24416–24429.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., and Etzler, M.E. (2009). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Chapter 16: Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans.
- Vaughan-Thomas, A., Young, R.D., Phillips, A.C., and Duance, V.C. (2001). Characterization of Type XI Collagen-Glycosaminoglycan Interactions. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 5303–5309.
- Veldkamp, C.T. (2005). The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. *Protein Science* *14*, 1071–1081.
- Veugelers, M., De Cat, B., Ceulemans, H., Bruystens, A.-M., Coomans, C., Dürr, J., Vermeesch, J., Marynen, P., and David, G. (1999). Glypican-6, a New Member of the Glypican Family of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 26968–26977.
- Vicente, C.M., da Silva, D.A., Sartorio, P.V., Silva, T.D., Saad, S.S., Nader, H.B., Forones, N.M., and Toma, L. (2018). Heparan Sulfate Proteoglycans in Human Colorectal Cancer. *Analytical Cellular Pathology* *2018*, 1–10.
- 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: Involvement of *HS3ST2* in Breast Cancer Cell Invasion and Chemosensitivity. *International Journal of Cancer* *135*, 2579–2592.
- Vives, R., Lortat-Jacob, H., and Fender, P. (2006). Heparan Sulphate Proteoglycans and Viral Vectors: Ally or Foe? *Current Gene Therapy* *6*, 35–44.
- 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. *Frontiers in Oncology* *3*.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 5604–5611.
- Vlodavsky, I., and Friedmann, Y. (2001). Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation* *108*, 341–347.
- Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., *et al.* (1999). Mammalian heparanase: Gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nature Medicine* *5*, 793–802.
- Vlodavsky, I., Gross-Cohen, M., Weissmann, M., Ilan, N., and Sanderson, R.D. (2018). Opposing Functions of Heparanase-1 and Heparanase-2 in Cancer Progression. *Trends in Biochemical Sciences* *43*, 18–31.
- Wahlström, T., and Arsenian Henriksson, M. (2015). Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* *1849*, 563–569.
- Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P., and Esko, J.D. (2005). Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nature Immunology* *6*, 902–910.
- Wang, S., Qiu, M., Xia, W., Xu, Y., Mao, Q., Wang, J., Dong, G., Xu, L., Yang, X., and Yin, R. (2016). Glypican-5 suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition of the lung adenocarcinoma by competitively binding to Wnt3a. *Oncotarget* *7*, 79736–79746.
- Wang, X., Sharp, J.S., Handel, T.M., and Prestegard, J.H. (2013). Chemokine Oligomerization in Cell Signaling and Migration. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* *117*, 531–578.
- Wang, X.F., Lin, H.Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H.F., and Weinberg, R.A. (1991). Expression cloning and characterization of the TGF- type III receptor. *Cell* *67*, 797–805.
- Wang, Z., Hsieh, P.H., Xu, Y., Thieker, D., Chai, E.J., Xie, S., Cooley, B., Woods, R.J., Chi, L., and Liu, J. (2017). Synthesis of 3-*O*-sulfated oligosaccharides to understand the relationship between structures and functions of heparan sulfate. *Journal of the American Chemical Society* *139*, 5249–5256.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 27733–27740.
- Weiss, R.J., Esko, J.D., and Tor, Y. (2017). Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry* *15*, 5656–5668.
- Weiss, R.J., Gordts, P.L.S.M., Le, D., Xu, D., Esko, J.D., and Tor, Y. (2015). Small molecule antagonists of cell-surface heparan sulfate and heparin–protein interactions. *Chemical Science* *6*, 5984–5993.
- Weissmann, B., Meyer, K. (1954). The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *Journal of the American Chemical society* *76*, 1753–1757.
- Weitz, J.I. (1997). Low-Molecular-Weight Heparins. *The New England Journal of Medicine* *337*, 688–698.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *111*, 15723–15728.
- Bornemann, D.J. (2004). Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* *131*, 1927–1938.
- West, D.C., Rees, C.G., Duchesne, L., Patey, S.J., Terry, C.J., Turnbull, J.E., Delehedde, M., Heegaard, C.W., Allain, F., Vanpouille, C., *et al.* (2005). Interactions of Multiple Heparin Binding Growth Factors with Neuropilin-1 and Potentiation of the Activity of Fibroblast Growth Factor-2. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 13457–13464.
- Wettreich, A., Sebollela, A., Carvalho, M.A., Azevedo, S.P., Borojevic, R., Ferreira, S.T., and Coelho-Sampaio, T. (1999). Acidic pH Modulates the Interaction between Human Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor and Glycosaminoglycans. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 31468–31475.
- Whitelock, J.M., and Iozzo, R.V. (2005). Heparan Sulfate: A Complex Polymer Charged with Biological Activity. *Chemical Reviews* *105*, 2745–2764.
- Whitfield, D.M., Choay, J., and Sarkar, B. (1992). Heavy metal binding to heparin disaccharides. I. Iduronic acid is the main binding site. *Biopolymers* *32*, 585–596.
- Wiedermann, C.J., and Romisch, J. (2002). The Anti-Inflammatory Actions of Antithrombin - A Review. *Acta Medica Austriaca* *29*, 89–92.
- Wielenga, V.J.M., van der Voort, R., Taher, T.E.I., Smit, L., Beuling, E.A., van Krimpen, C., Spaargaren, M., and Pals, S.T. (2000). Expression of c-Met and Heparan-Sulfate Proteoglycan Forms of CD44 in Colorectal Cancer. *The American Journal of Pathology* *157*, 1563–1573.
- Wiksten, J.-P., Lundin, J., Nordling, S., Lundin, M., Kokkola, A., von Boguslawski, K., and Haglund, C. (2001). Epithelial and stromal syndecan-1 expression as predictor of outcome in patients with gastric cancer. *International Journal of Cancer* *95*, 1–6.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* *1774*, 1470–1476.
- Williams, K., Motiani, K., Giridhar, P.V., and Kasper, S. (2013). CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Experimental Biology and Medicine* *238*, 324–338.
- Williamson, D., Selfe, J., Gordon, T., Lu, Y.-J., Pritchard-Jones, K., Murai, K., Jones, P., Workman, P., and Shipley, J. (2007). Role for Amplification and Expression of Glypican-5 in Rhabdomyosarcoma. *Cancer Research* *67*, 57–65.
- Winterhoff, B., Freyer, L., Hammond, E., Giri, S., Mondal, S., Roy, D., Teoman, A., Mullany, S.A., Hoffmann, R., von Bismarck, A., *et al.* (2015). PG545 enhances anti-cancer activity of chemotherapy in ovarian models and increases surrogate biomarkers such as VEGF in preclinical and clinical plasma samples. *European Journal of Cancer* *51*, 879–892.
- Wittrup, A., Zhang, S.-H., ten Dam, G.B., van Kuppevelt, T.H., Bengtson, P., Johansson, M., Welch, J., Mörgelin, M., and Belting, M. (2009). ScFv Antibody-induced Translocation of Cell-surface Heparan Sulfate Proteoglycan to Endocytic Vesicles: evidence for heparan sulfate epitope specificity and role of both syndecan and glypican. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 32959–32967.
- Woods, A., and Couchman, J.R. (2001). Syndecan-4 and focal adhesion function. *Current Opinion in Cell Biology* *13*, 578–583.
- Woods, A., Longley, R.L., Tumova, S., and Couchman, J.R. (2000). Syndecan-4 Binding to the High Affinity Heparin-Binding Domain of Fibronectin Drives Focal Adhesion Formation in Fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *374*, 66–72.

- Wu, Y., Liu, H., and Ding, H.-G. (2016). GPC-3 in hepatocellular carcinoma: current perspectives. *Journal of Hepatocellular Carcinoma* *Volume 3*, 63–67.
- Wu, Y., Liu, H., Weng, H., Zhang, X., Li, P., Fan, C.-L., Li, B., Dong, P.-L., Li, L., Dooley, S., *et al.* (2015). Glypican-3 promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through ERK signaling pathway. *International Journal of Oncology* *46*, 1275–1285.
- Wu, Z.L., Lech, M., Beeler, D.L., and Rosenberg, R.D. (2004). Determining Heparan Sulfate Structure in the Vicinity of Specific Sulfotransferase Recognition Sites by Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 1861–1866.
- Xia, G., Chen, J., Tiwari, V., Ju, W., Li, J.-P., Malmström, 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. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 37912–37919.
- Xu, D., and Esko, J.D. (2014). Demystifying Heparan Sulfate–Protein Interactions. *Annual Review of Biochemistry* *83*, 129–157.
- Xu, D., Fuster, M.M., Lawrence, R., and Esko, J.D. (2011). Heparan Sulfate Regulates VEGF₁₆₅- and VEGF₁₂₁-mediated Vascular Hyperpermeability. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 737–745.
- Xu, D., Moon, A.F., Song, D., Pedersen, L.C., and Liu, J. (2008). Engineering sulfotransferases to modify heparan sulfate. *Nature Chemical Biology* *4*, 200–202.
- 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. *Biochemical Journal* *385*, 451–459.
- 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.
- Yabe, T., Shukla, D., Spear, P.G., Rosenberg, R.D., Seeberger, P.H., and Shworak, N.W. (2001). Portable sulphotransferase domain determines sequence specificity of heparan sulphate 3-*O*-sulphotransferases. *Biochemical Journal* *359*, 235–241.
- Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M., Sugahara, K., Khoo, K.H., Morris, H.R., and Dell, A. (1993). Structural studies on the bacterial lyase-resistant tetrasaccharides derived from antithrombin III-binding site of porcine intestinal heparin. *Journal of Biological Chemistry* *268*, 4780–4787.
- Yamamoto, A., Uchiyama, K., Nara, T., Nishimura, N., Hayasaka, M., Hanaoka, K., and Yamamoto, T. (2014). Structural Abnormalities of Corpus Callosum and Cortical Axonal Tracts Accompanied by Decreased Anxiety-Like Behavior and Lowered Sociability in *Spock3*- Mutant Mice. *Developmental Neuroscience* *36*, 381–395.
- Yan, F., Zheng, Y., and Huang, L. (2013). Adenovirus-mediated combined anti-angiogenic and pro-apoptotic gene therapy enhances antitumor efficacy in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters* *5*, 348–354.
- Yang, Y., MacLeod, V., Miao, H.-Q., Theus, A., Zhan, F., Shaughnessy, J.D., Sawyer, J., Li, J.-P., Zcharia, E., Vlodaysky, I., *et al.* (2007). Heparanase Enhances Syndecan-1 Shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 13326–13333.
- Ye, S., Luo, Y., Lu, W., Jones, R.B., Linhardt, R.J., Capila, I., Toida, T., Kan, M., Pelletier, H., and McKeenan, W.L. (2001). Structural Basis for Interaction of FGF-1, FGF-2, and FGF-7 with Different Heparan Sulfate Motifs. *Biochemistry* *40*, 14429–14439.
- Yin, L., He, J., Xue, J., Na, F., Tong, R., Wang, J., Gao, H., Tang, F., Mo, X., Deng, L., *et al.* (2018). PDGFR- β inhibitor slows tumor growth but increases metastasis in combined radiotherapy and Endostar therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* *99*, 615–621.
- Yin, M., Ma, W., and An, L. (2017). Cortactin in cancer cell migration and invasion. *Oncotarget* *8*, 88232–88243.

- Yip, G.W. (2006). Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* *5*, 2139–2148.
- Yoneda, A., Lendorf, M.E., Couchman, J.R., and Mulhaupt, H.A.B. (2012). Breast and Ovarian Cancers: A Survey and Possible Roles for the Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* *60*, 9–21.
- 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. *Journal of Virology* *77*, 9221–9231.
- Yost, H.J. (1992). Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix. *Nature* *357*, 158–161.
- Yu, G., Gunay, N.S., Linhardt, R.J., Toida, T., Fareed, J., Hoppensteadt, D.A., Shadid, H., Ferro, V., Li, C., Fewings, K., *et al.* (2002). Preparation and anticoagulant activity of the phosphosulfomannan PI-88. *European Journal of Medicinal Chemistry* *37*, 783–791.
- Yu, M., Han, Y., Zhuo, H., and Zhang, S. (2018). Endostar, a Modified Endostatin Induces Vascular Normalization to Improve Chemotherapy Efficacy Through Suppression of Src Signaling Pathway. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* *33*, 131–138.
- Yu, W., Inoue, J., Imoto, I., Matsuo, Y., Karpas, A., and Inazawa, J. (2003). GPC5 is a possible target for the 13q31-q32 amplification detected in lymphoma cell lines. *Journal of Human Genetics* *48*, 331–335.
- Zak, B.M., Crawford, B.E., and Esko, J.D. (2002). Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1573*, 346–355.
- Zcharia, E., Metzger, S., Chajek-Shaul, T., Aingorn, H., Elkin, M., Friedmann, Y., Weinstein, T., Li, J.-P., Lindahl, U., and Vlodavsky, I. (2004). Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization, and feeding behavior. *The FASEB Journal* *18*, 252–263.
- Zehe, C., Engling, A., Wegehingel, S., Schafer, T., and Nickel, W. (2006). Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 15479–15484.
- Zetser, A., Bashenko, Y., Edovitsky, E., Levy-Adam, F., Vlodavsky, I., and Ilan, N. (2006). Heparanase Induces Vascular Endothelial Growth Factor Expression: Correlation with p38 Phosphorylation Levels and Src Activation. *Cancer Research* *66*, 1455–1463.
- Zhang, C., Zhang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Xu, Y., and Liu, S. (2011). A lung cancer gene GPC5 could also be crucial in breast cancer. *Molecular Genetics and Metabolism* *103*, 104–105.
- Zhang, G., Zhang, X., Wang, X., and Li, J.-P. (2014). Towards Understanding the Roles of Heparan Sulfate Proteoglycans in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* *2014*, 1–9.
- Zhang, L. (2010a) Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* *93*, 1–17.
- Zhang, L. (2010b). Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* *93*, 1–17.
- Zhang, L., Lawrence, R., Schwartz, J.J., Bai, X., Wei, G., Esko, J.D., and Rosenberg, R.D. (2001). The Effect of Precursor Structures on the Action of Glucosaminyl 3-*O*-Sulfotransferase-1 and the Biosynthesis of Anticoagulant Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 28806–28813.
- Zhang, L., Lawrence, R., Schwartz, J.J., Bai, X., Wei, G., Esko, J.D., and Rosenberg, R.D. (2001). The Effect of Precursor Structures on the Action of Glucosaminyl 3-*O*-Sulfotransferase-1 and the Biosynthesis of Anticoagulant Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 28806–28813.

- 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*-Sulfotransferase-3B1 (HS3ST3B1) Promotes Angiogenesis and Proliferation by Induction of VEGF in Acute Myeloid Leukemia Cells: Role of HS3ST3B1 in AML. *Journal of Cellular Biochemistry* *116*, 1101–1112.
- Zhang, L., Yoshida, K., Liu, J., and Rosenberg, R.D. (1999). Anticoagulant Heparan Sulfate Precursor Structures in F9 Embryonal Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 5681–5691.
- Zhang, X., Liu, K., Zhang, T., Wang, Z., Qin, X., Jing, X., Wu, H., Ji, X., He, Y., and Zhao, R. (2017). Cortactin promotes colorectal cancer cell proliferation by activating the EGFR-MAPK pathway. *Oncotarget* *8*.
- Zhang, Z., Jiang, H., Wang, Y., and Shi, M. (2018). Heparan sulfate D-glucosamine 3-*O*-sulfotransferase 3B1 is a novel regulator of transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and regulated by miR-218 in nonsmall cell lung cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* *14*, 24.
- Zhang, Z., Jiang, H., Wang, Y., and Shi, M. (2018). Heparan sulfate D-glucosamine 3-*O*-sulfotransferase 3B1 is a novel regulator of transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and regulated by miR-218 in nonsmall cell lung cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* *14*, 24.
- Zhang, Z., Liu, X., Chen, J., Su, H., Luo, Q., Ye, J., Tang, N., Zhang, W., Chen, W., Ko, B.C.B., *et al.* (2010). Heparin sulphate d-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase 3B1 plays a role in HBV replication. *Virology* *406*, 280–285.
- Zhao, J., Gu, L., Li, C., Ma, W., and Ni, Z. (2014). Investigation of a novel biomarker, neuropilin-1, and its application for poor prognosis in acute myeloid leukemia patients. *Tumor Biology* *35*, 6919–6924.
- Zhen, Y., Haugsten, E.M., Singh, S.K., and Wesche, J. (2018). Proximity Labeling by a Recombinant APEX2-FGF1 Fusion Protein Reveals Interaction of FGF1 with the Proteoglycans CD44 and CSPG4. *Biochemistry* *57*, 3807–3816.
- Zhou, H., Roy, S., Cochran, E., Zouaoui, R., Chu, C.L., Duffner, J., Zhao, G., Smith, S., Galcheva-Gargova, Z., Karlgren, J., *et al.* (2011). M402, a Novel Heparan Sulfate Mimetic, Targets Multiple Pathways Implicated in Tumor Progression and Metastasis. *PLoS ONE* *6*, e21106.
- Zhu, H., Cai, H., Tang, M., and Tang, J. (2014). Neuropilin-1 is overexpressed in osteosarcoma and contributes to tumor progression and poor prognosis. *Clinical and Translational Oncology* *16*, 732–738.
- Zhu, X., Hsu, B.T., and Rees, D.C. (1993). Structural studies of the binding of the anti-ulcer drug sucrose octasulfate to acidic fibroblast growth factor. *Structure* *15*, 27–34.
- Zimmermann, P., Zhang, Z., Degeest, G., Mortier, E., Leenaerts, I., Coomans, C., Schulz, J., N’Kuli, F., Courtoy, P.J., and David, G. (2005). Syndecan Recycling Is Controlled by Syntenin-PIP2 Interaction and Arf6. *Developmental Cell* *9*, 377–388.
- Zöller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature Reviews Cancer* *11*, 254–267.
- Zulueta, M.M.L., Chyan, C.-L., and Hung, S.-C. (2018). Structural analysis of synthetic heparan sulfate oligosaccharides with fibroblast growth factors and heparin-binding hemagglutinin. *Current Opinion in Structural Biology* *50*, 126–133.
- 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. *Journal of Cardiovascular Translational Research* *1*, 236–240.

Annexes

Annexe 1

“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 Denys

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 catalyzed 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 signaling 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.

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 Denys

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), UMR 8576, CNRS, University of Lille, France

Keywords

apoptosis; cyclophilin; heparan sulfates; HSV-1 glycoprotein D; macrophages

Correspondence

A. Denys, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576, CNRS, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Fax: +33 3 20 43 65 55

Tel: +33 3 20 33 72 39

E-mail: agnes.denys@univ-lille1.fr

(Received 15 July 2016, revised 21 September 2016, accepted 14 October 2016)

doi:10.1002/2211-5463.12145

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 D (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 herpes virus entry mediator (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.

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

Abbreviations

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

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*-acetylglucosamine (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 herpes virus entry mediator (HVEM), 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 haematopoietic 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 nuclear factor- κ B (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 proinflammatory response in primary macrophages [27]. These findings prompted us to investigate whether both 3-*O*-sulfated ligands could share the same antiapoptotic 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 antiapoptotic 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.* [18] had reported that a soluble form of HSV-1 gD was capable of activating NF- κ B pathway in U937 myeloid cells. 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 extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 and Akt kinases. Exposure of macrophages to $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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. A time-course analysis revealed that the activation of the kinases was

maximal at 30 min poststimulation and extended over 2 h of stimulation (Fig. 1).

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 reverse transcription-polymerase chain reaction (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 (Fig. 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 (Fig. 2B). The expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 in macrophages was confirmed by western blot (Fig. 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 nonspecific scattered staining of macrophages was observed with primary antibody alone (Fig. 2D, panel a). In contrast, incubation with 250 nM HSV-1 gD ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) prior to the addition of Alexa-488 antibody led to an additional fluorescent staining located at the cell membrane of macrophages (Fig. 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 (Fig. 2D, panel c) and completely abolished with a 100-fold molar excess of CyPB (Fig. 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- κ B in

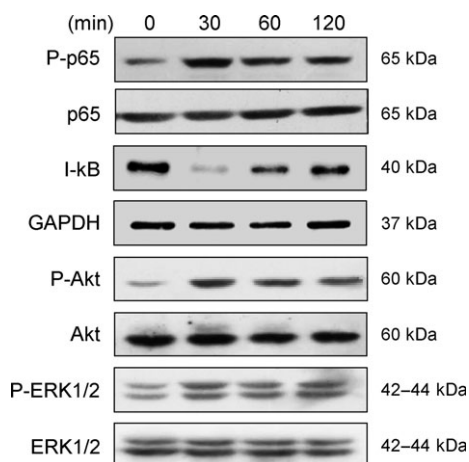


Fig. 1. HSV-1 gD-induced signalling in human primary macrophages. Monocyte-derived macrophages were stimulated with HSV-1 gD ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for the indicated times. Following cell lysis, proteins were separated by SDS/PAGE and subjected to western blotting with antibodies to I- 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.

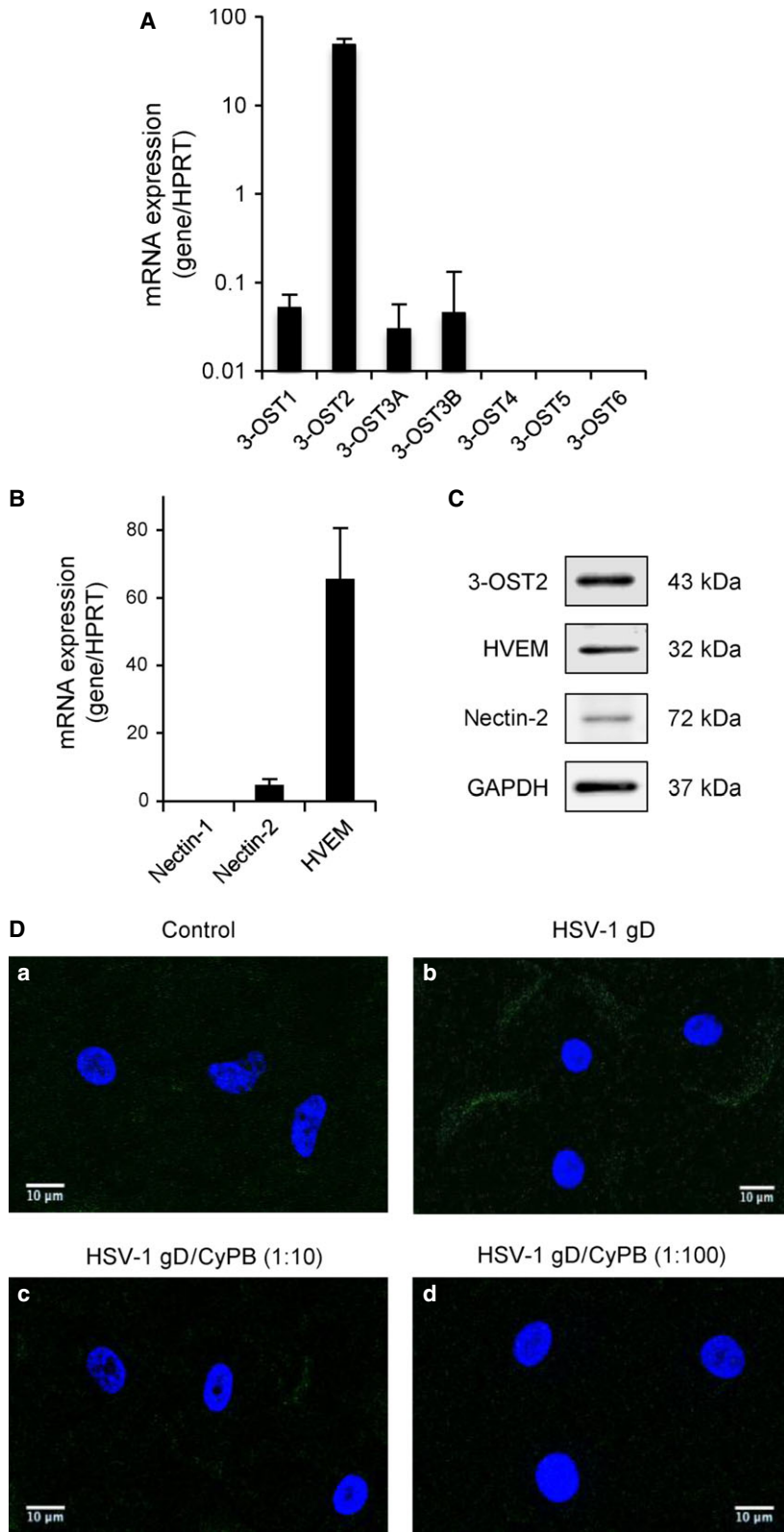


Fig. 2. Identification of the HSV-1 gD binding sites in primary macrophages. Analysis of the expression of mRNA encoding 3-O-sulfated HS-generating enzymes (A) and HSV-gD receptors (B). Following reverse transcription of RNA extracted from primary macrophages, the level of mRNA for 3-OSTs, HVEM, nectin-1 and nectin-2 was quantified by real-time RT-PCR. Relative transcript abundance was normalized to HPRT mRNA. Data are means \pm SD 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 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (250 nM) of His-tagged gD in the absence (panel b) or presence of CyPB at $2.5 \mu\text{M}$ (panel c) or $25 \mu\text{M}$ (panel d). After 1 h of incubation at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 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 = $10 \mu\text{m}$. Images were representative of five experiments conducted with cells from distinct donors.

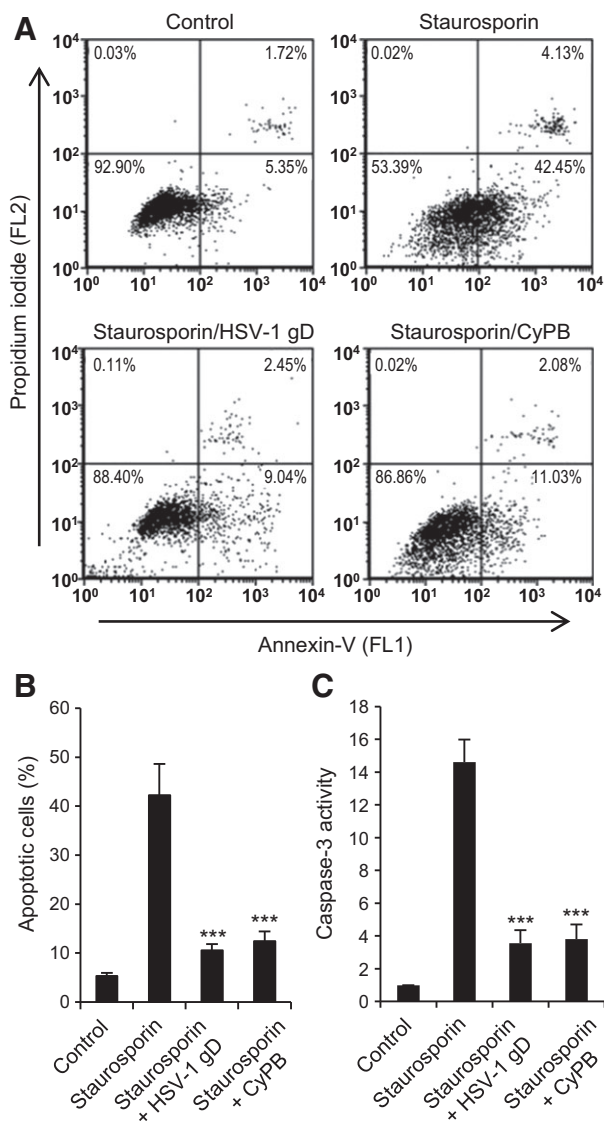


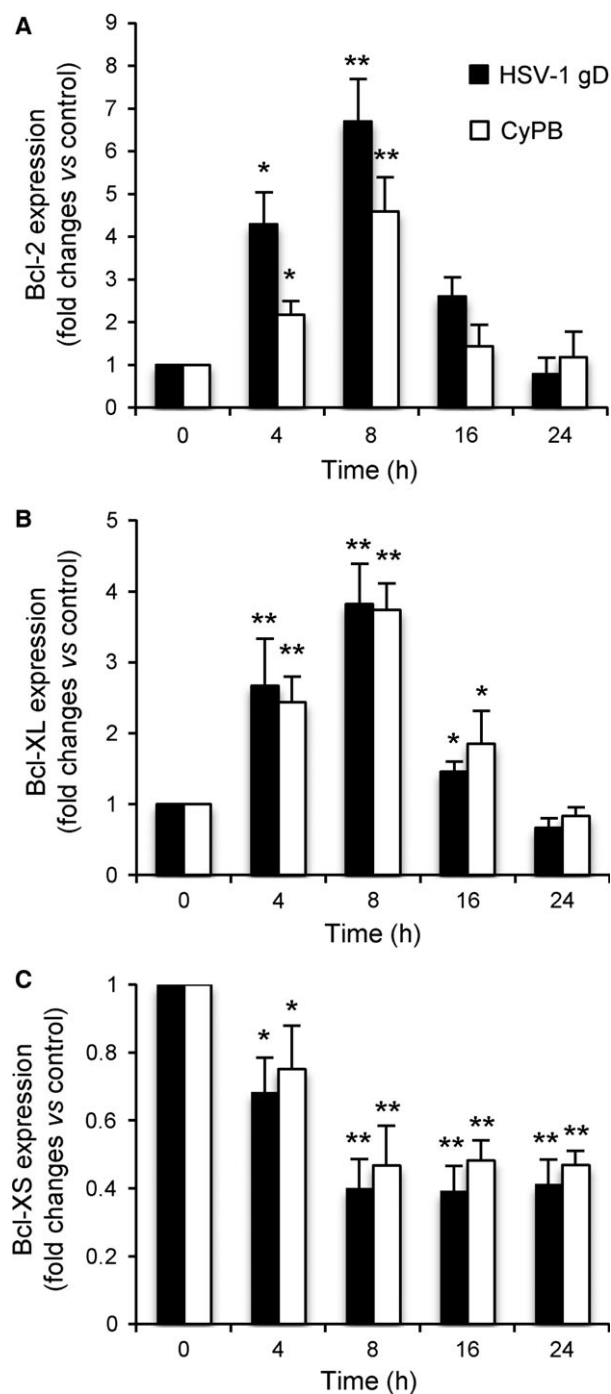
Fig. 3. Protective effects of HSV-1 gD and CyPB against apoptosis in primary macrophages. (A, B) Flow cytometry analysis of staurosporin-induced apoptosis. Macrophages were either untreated or treated with HSV-1 gD or CyPB (both at $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 8 h and subsequently exposed to staurosporin ($0.5 \mu\text{M}$) 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-plots 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 SD 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 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 SD of five independent experiments performed with cells isolated from distinct donors ($***P < 0.001$, significantly different when compared to cells exposed to staurosporin alone).

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.* [17] reported that HSV-1 was capable of protecting U937 cells against apoptosis. They also demonstrated that cell treatment with recombinant HSV-1 gD was efficient enough to reproduce the antiapoptotic 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 $0.5 \mu\text{M}$ staurosporin. We decided to use this proapoptotic drug because of its efficiency to induce a full activation of caspase-3 in primary macrophages [18,30,31]. The experimental conditions for induction of apoptosis by staurosporin were retained to reduce necrosing effects of the proapoptotic 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 (Fig. 3A,B). In the absence of any treatment, the percentage of apoptosis (including early and late apoptotic cells) was $< 8\%$. As expected, cell treatment with staurosporin resulted in a strong increase in apoptosis, with a number of early apoptotic cells corresponding to $42 \pm 6\%$ 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 $10.5 \pm 2\%$, 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 $12.4 \pm 3\%$, 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 Fig. 3C, we found that cell treatment with staurosporin strongly increased the activity of

Fig. 4. Modulation of the expression of apoptotic genes in primary macrophages. Macrophages were incubated in the presence of HSV-1 gD or CyPB, both at $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 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 nonstimulated cells. Values correspond to means \pm SD of five independent experiments conducted with macrophages from distinct donors (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different when compared to unstimulated cells).

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 antiapoptotic genes in macrophages

Previous works reported that the expression of *Bcl-2* and *Bcl-2L1* genes was upregulated 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 B-cell lymphoma (Bcl)-XL, exhibits antiapoptotic activity, while the shorter form, termed Bcl-XS, is a promoter of apoptosis [33]. Hence, we analysed the ability of HSV-1 gD and CyPB to modulate the expression of mRNA encoding Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-XS in macrophages using real-time RT-PCR (Fig. 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 poststimulation. Concomitantly, the level of mRNA encoding Bcl-XS decreased in cells exposed to HSV-1 gD or CyPB. The inhibitory effect ($\sim 50\%$) was maximal at 8 h poststimulation 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 antiapoptotic factors, which is consistent with the protective properties of these proteins against apoptosis.

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 small-interfering RNA (siRNA) targeting 3-OST2, HVEM and nectin-2 (termed si-3-OST2, si-HVEM and si-nectin-2, respectively) resulted in a significant downregulation of corresponding mRNA (Fig. 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 (Fig. 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 (Fig. 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

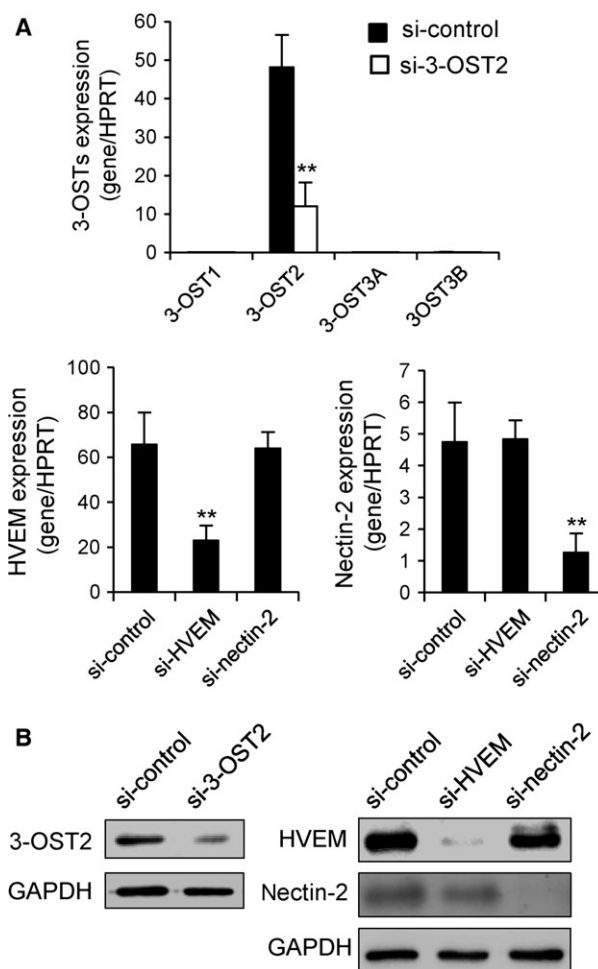


Fig. 5. Downregulation of the expression of nectin-2, HVEM or 3-OST2 by RNA interference. Synthetic siRNA (termed si-3-OST2, si-HVEM and si-nectin-2) were used to specifically inhibit the expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 in human macrophages. Following transfection of macrophages with si-3-OST2, 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 SD of five independent experiments conducted with macrophages from distinct donors (** $P < 0.01$, significantly different when compared to cells transfected with si-control). (B) The efficacy of siRNA to downregulate 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.

by HSV-1 gD and CyPB. In contrast, downregulation 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

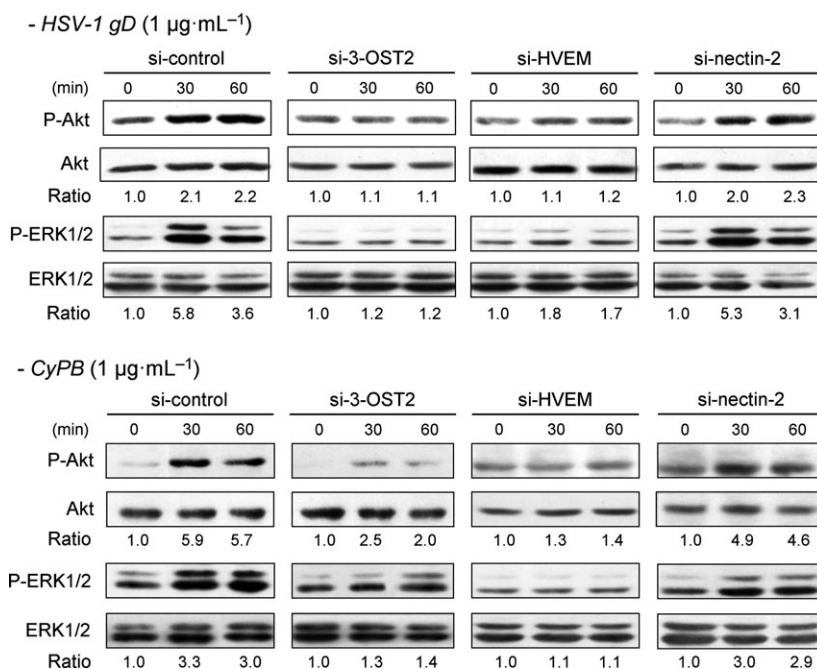


Fig. 6. Effect of silencing the expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 on HSV-1 gD- and CyPB-induced signalling in macrophages. The contribution of 3-OST2 (as a 3-*O*-sulfated HS-generating enzyme) and of HVEM and nectin-2 to the activation of signalling pathways was evaluated by analysing the phosphorylation 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 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.

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.

Role of HVEM and 3-*O*-sulfated HS in the antiapoptotic 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 antiapoptotic properties of both proteins in siRNA-treated 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 (Fig. 7A) and caspase-3 activation (Fig. 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, downregulation 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 and Bcl-XS in siRNA-treated macrophages exposed to HSV-1 gD and CyPB (Fig. 7C). First, we found that cell treatment with negative control siRNA or si-nectin-2 did not significantly modify the expression of the genes encoding Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-XS in response to both proteins. As previously shown in Fig. 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 and 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

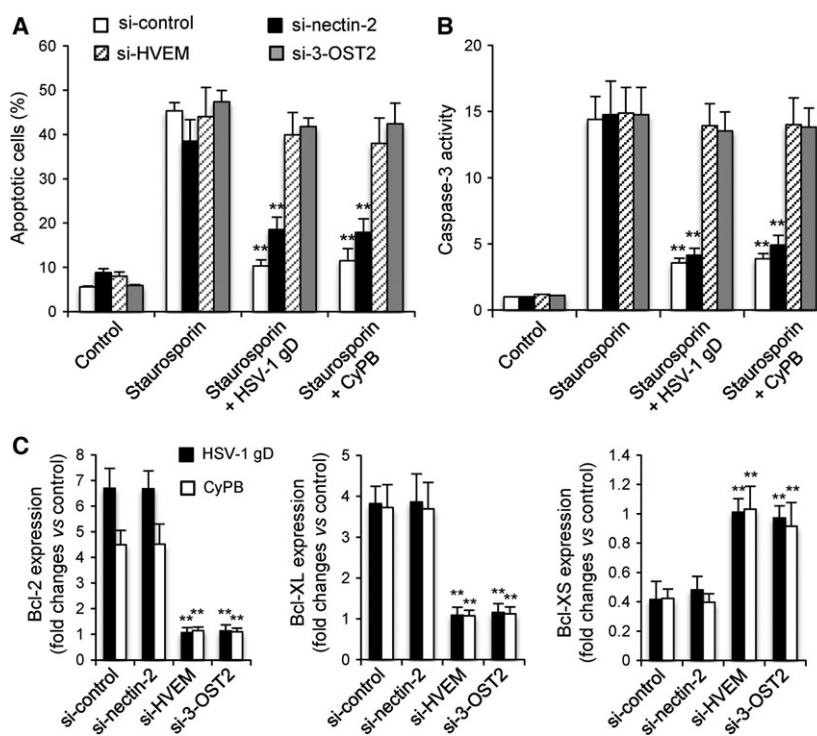


Fig. 7. Effects of silencing the expression of 3-OST2, HVEM and nectin-2 on the anti-apoptotic properties of HSV-1 gD and CyPB. The contribution of 3-OST2 (as a 3-*O*-sulfated HS-generating enzyme) and of HVEM and nectin-2 to the protective effect of HSV-1 gD and CyPB was analysed by measuring staurosporin-induced apoptosis in siRNA-treated macrophages. Following treatment with siRNA for 48 h, cells were incubated or not with HSV-1 gD and CyPB ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 8 h, after which they were exposed to staurosporin ($0.5 \mu\text{M}$) 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 SD 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 SD 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 ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 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 nonstimulated cells and correspond to means \pm SD of three separate experiments (** $P < 0.01$, significantly different when compared to the results obtained with negative control siRNA).

mechanism dependent on CD147 [19–21,35–37]. Thus, we analysed the antiapoptotic 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 $< 80\%$, 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 antiapoptotic proteins in si-CD147-treated cells (data not shown). Thus, both

proteins retained their antiapoptotic activity in si-CD147-treated cells, which suggests that CD147 is not involved in the antiapoptotic 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 bioavailability 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 control 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]. However, we demonstrated that CyPB was effective in reducing proinflammatory 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 proapoptotic pathways in monocyte-derived macrophages [30]. In our experimental model, the protective effects of HSV-1 gD were accompanied by upregulation of genes encoding the antiapoptotic Bcl-2 and Bcl-XL and concomitant decrease in the expression of proapoptotic Bcl-XS, which is consistent with previous results obtained in myeloid cells and fibroblasts. In parallel experiments, we found that CyPB triggered the same antiapoptotic 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 promigratory 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 and 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 downregulation 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 the other 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 observe any direct interaction with CyPB, suggesting that CD147 is rather a cosignalling 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 antiapoptotic 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 antiapoptotic proteins in macrophages. Thus, these results suggested that CD147 did not participate in the common antiapoptotic activity of CyPB and HSV-1gD. Altogether, our findings demonstrate for the first time that HSV-1 gD and CyPB share the same antiapoptotic 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.* [40] reported that overexpressed CyPB decreased MPP⁺-induced oxidative stress and inhibited the activation of proapoptotic molecules in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 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 antiapoptotic 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 proinflammatory macrophages, via a mechanism dependent on the expression of Bcl-3 [27]. On the other hand, HSV-1 gD was described to mimic the interaction between HVEM and 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 immunocompromised 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.* [48] identified anti-HSV-1 agents in two groups of peptides showing either alternating (G1) or clustered (G2) positive charges. 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.* [27]. The efficacy of LPS removal was checked using a cell-based assay with HEK-Blue™-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 centre (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 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and found > 95%. Macrophages were then obtained by incubating freshly isolated monocytes (1×10^6 cells·mL⁻¹) for 5 days in RPMI 1640 medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum and 10 ng·mL⁻¹ of M-CSF (Peprotech, Rocky Hill, 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 µg of total RNA using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific). Synthetic primers for 3-OSTs were described in Martinez *et al.* [28]. Synthetic primers for HVEM, nectin-2, Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-XS were designed using Primer-Blast (NCBI) according to published sequences: HVEM (NM_003820.3), 5'-GTGTGGTGTTTA GTGGATAC-3' (forward) and 5'-ACAAATAGAAAACA GGAGCC-3' (reverse); nectin-1 (NM_002855.4), 5'-CATC GTCAACTACCACAT-3' (forward) and 5'-CCTCAATGG TTACTCAG-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'-TGAACAGGTAGTGAATG AAC-3' (forward) and 5'-TCTCCTTGCTACGCTT-3' (reverse), and Bcl-XS (NM_001191.2), 5'-CAGAGCTTTG AACAGGATAC-3' (forward) and 5'-GGTAGAGTGG ATGGTCAG-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 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) was used as a control to normalize the expression of the 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 Scientific), 1 µL of forward primer (15 µM), 1 µL of reverse primer (15 µM) and 8.5 µL of water. It also included a nontemplate 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 µg·mL⁻¹) for 8 h, apoptosis

was induced by the addition of 0.5 µM staurosporin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) for 4 h. For apoptosis analysis, macrophages (2 × 10⁵ cells per point) were stained with annexin-V and 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 using the caspase-3 assay fluorimetric kit (Sigma-Aldrich), according to manufacturer's instructions. For each experimental condition, 2.5 × 10⁵ 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 using a fluorimeter microplate reader. Values of absorbance were converted in caspase-3 activity 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 × 10⁶ per point) were lysed in 75 µL 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 [Tris buffer saline (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 using IMAGE J software. (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2016)

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'-GCGAAGGU CUCACGAGGUCdTdT-3'; si-nectin-2, 5'-GUCACGGUC ACCUGCAAAGdTdT-3'; si-3-OST2, 5'-CGGACAAG CACUUCUAUUUdTdT-3'; si-CD147, 5'-GGUUCUUCG UGAGUUCUCdTdT-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 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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, Hilden, Germany) in blocking buffer. Cells were also stained with $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ DAPI (Sigma-Aldrich) for 10 min to visualize cell nuclei. Immunostaining was detected with an inverted Zeiss LSM 780 microscope (Oberkochen, Germany) with a 63 \times oil immersion lens at room temperature. Data were collected using the ZEISS ZEN PRO 2.1 software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) 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.

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 and 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 and Lindahl U (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* **108**, 169–173.
- 4 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.
- 5 Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD and Spear PG (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, 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.
- 7 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.
- 8 O'Donnell CD, Tiwari V, Oh M-J and Shukla D (2006) A role for heparan sulfate 3-*O*-sulphotransferase 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 and 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 and 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 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.
- 13 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**, 2643–2650.
- 14 Tiwari V, Oh M-J, Kovacs M, Shukla SY, 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.
- 15 Kopp SJ, Banisadr G, Glajch K, Maurer UE, Grünewald K, Miller RJ, Osten P and Spear PG (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 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.
- 17 Medici MA, Sciortino MT, 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.
- 18 Sciortino MT, Medici MA, Marino-Merlo F, Zaccaria D, Giuffrè-Cuculetto M, Venuti A, Grelli S, Bramanti P and Mastino A (2008) Involvement of gD/HVEM interaction in NF-kB-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 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 USA* **99**, 2714–2719.
- 20 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.
- 21 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.
- 22 Deligny A, Denys A, Marcant A, Melchior A, Mazurier J, van Kuppevelt TH 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.
- 23 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.
- 24 Vanpouille C, Deligny A, Delehedde M, Denys A, Melchior A, Liénard X, Lyon M, Mazurier J, Fernig DG 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.
- 25 Liu J, Shriver Z, Blaiklock P, Yoshida K, Sasisekharan R and 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, Raska CS, Yoshida K, Eisenberg RJ, Cohen G *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 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.
- 28 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.
- 29 Patel VN, Lombaert IMA, Cowherd SN, Shworak NW, Xu Y, Liu J and Hoffman MP (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 KW and 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 and Liles WC (1997) Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med* **185**, 1511–1516.
- 32 MacLeod IJ 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.
- 33 Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G and Thompson CB (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-Cuculietto M, Venuti A, Grelli S and Mastino A (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 and 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, Bukrinsky MI and Constant SL (2005) Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol* **175**, 517–522.
- 37 Yurchenko V, Constant S, Eisenmesser E and Bukrinsky M (2010) Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol* **160**, 305–317.
- 38 Xiong L, Edwards CK and ZhouInt L (2014) The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: a review of the current scientific literature. *Int J Mol Sci* **15**, 17411–17441.
- 39 Cantor JM and 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, Yoon KS, Ha J, Kang I and Choe W (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, Jung MH, Park C, Kang I, Ha J *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 and Sedý JR (2006) Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat Rev Immunol* **6**, 671–681.
- 43 Kaye S and Choudhary A (2006) Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* **25**, 355–380.
- 44 Akhtar J and Shukla D (2009) Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J* **276**, 7228–7236.
- 45 Yu X and He S (2016) The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways. *Virology* **13**, 77–84.
- 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, 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.
- 48 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.
- 49 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.
- 50 Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, 2002–2007.

Annexe 2

“Heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase 2 (HS3ST2) displays an unexpected subcellular localization in the plasma membrane”

Maxime Delos, François Foulquier, Charles Hellec, Dorothée Vicogne, Alexandre Fifre, Mathieu Carpentier, Dulce Papy-Garcia, Fabrice Allain and Agnès Denys

Abstract

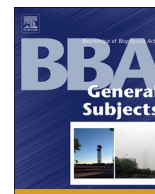
Background - Heparan sulfate (HS) 3-*O*-sulfation can be catalysed by seven 3-*O*-sulfotransferases (HS3STs) in humans, still it is the rarest modification in HS and its biological function is yet misunderstood. HS3ST2 and HS3ST3B exhibit the same activity in vitro. They are however differently expressed in macrophages depending on cell environment, which suggests that they may be involved in distinct cellular processes. Here, we hypothesized that both isozymes might also display distinct subcellular localizations.

Methods – The subcellular distribution of HS3ST2 and HS3ST3B was analysed by using overexpression systems in HeLa cells. The localization of endogenous HS3ST2 was confirmed by immunostaining in primary macrophages.

Results – We found that HS3ST3B was only localized in the Golgi apparatus and no difference between full-length enzyme and truncated construct depleted of its catalytic domain was observed. In contrast, HS3ST2 was clearly visualized at the plasma membrane. Its truncated form remained in the Golgi apparatus, meaning that the catalytic domain might support correct addressing of HS3ST2 to cell surface. Moreover, we found a partial co-localization of HS3ST2 with syndecan-2 in HeLa cells and primary macrophages. Silencing the expression of this proteoglycan altered the localization of HS3ST2, which suggests that syndecan-2 is required to address the isozyme outside of the Golgi apparatus.

Conclusions – We demonstrated that HS3ST3B is a Golgi-resident isozyme, while HS3ST2 is addressed to the plasma membrane with syndecan-2.

General Significance - The membrane localization of HS3ST2 suggest that this enzyme may participate in discrete processes that occur at the cell surface.



Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 2 (HS3ST2) displays an unexpected subcellular localization in the plasma membrane

Maxime Delos^a, François Foulquier^a, Charles Hellec^a, Dorothée Vicogne^a, Alexandre Fifre^b, Mathieu Carpentier^a, Dulce Papy-Garcia^b, Fabrice Allain^a, Agnès Denys^{a,*}

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

^b Laboratoire Croissance, Réparation et Régénération Tissulaires (CRRET), CNRS ERL 9215, Université Paris-Est-Créteil, F-94000 Créteil, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Heparan sulfate
Sulfotransferase
Subcellular localization
Proteoglycan
Glycobiology

ABSTRACT

Background: Heparan sulfate (HS) 3-O-sulfation can be catalysed by seven 3-O-sulfotransferases (HS3STs) in humans, still it is the rarest modification in HS and its biological function is yet misunderstood. HS3ST2 and HS3ST3B exhibit the same activity *in vitro*. They are however differently expressed in macrophages depending on cell environment, which suggests that they may be involved in distinct cellular processes. Here, we hypothesized that both isozymes might also display distinct subcellular localizations.

Methods: The subcellular distribution of HS3ST2 and HS3ST3B was analysed by using overexpression systems in HeLa cells. The localization of endogenous HS3ST2 was confirmed by immunostaining in primary macrophages. **Results:** We found that HS3ST3B was only localized in the Golgi apparatus and no difference between full-length enzyme and truncated construct depleted of its catalytic domain was observed. In contrast, HS3ST2 was clearly visualized at the plasma membrane. Its truncated form remained in the Golgi apparatus, meaning that the catalytic domain might support correct addressing of HS3ST2 to cell surface. Moreover, we found a partial co-localization of HS3ST2 with syndecan-2 in HeLa cells and primary macrophages. Silencing the expression of this proteoglycan altered the localization of HS3ST2, which suggests that syndecan-2 is required to address the isozyme outside of the Golgi apparatus.

Conclusions: We demonstrated that HS3ST3B is a Golgi-resident isozyme, while HS3ST2 is addressed to the plasma membrane with syndecan-2.

General significance: The membrane localization of HS3ST2 suggests that this enzyme may participate in discrete processes that occur at the cell surface.

1. Introduction

Heparan sulfate (HS) is sulfated and linear polysaccharides, which are covalently linked 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 [1,2]. Syndecans, which are represented by four members, are the major source of cell surface HS. The protein core of these proteoglycans consists of a 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 [3,4].

As it transits in the Golgi apparatus, HS precursor composed of alternating glucuronic acid (GlcUA) and N-acetyl glucosamine (GlcN) is extended *via* EXT1/EXT2 copolymerases and then sequentially

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; ER, endoplasmic reticulum; EXT1, exostosin tumor-like 1; FCS, foetal calf serum; GlcN, D-glucosamine; GlcNS, N-sulfated GlcN; GlcUA, D-glucuronic acid; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; HS, heparan sulfate; HS2ST, HS3ST, HS6ST, HS 2-O, HS 3-O and HS 6-O-sulfotransferases; HSV-1, type 1 herpes simplex virus; IdoUA, L-iduronic acid; NDST, N-deacetylase/N-sulfotransferase; PBS, phosphate buffered saline; RFP, red fluorescent protein; siRNA, small-interfering RNA; TBS, Tris buffered saline; WT, wild-type

* Corresponding author at: Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

E-mail address: agnes.denys@univ-lille1.fr (A. Denys).

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.013>

Received 2 November 2017; Received in revised form 10 April 2018; Accepted 12 April 2018

Available online 13 April 2018

0304-4165/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

modified through the action of *N*-deacetylases/*N*-sulfotransferases (NDSTs), C5-epimerase, which converts some GlcUA to iduronic acid (IdoUA) residues, and HS 2-*O*, 6-*O*, and 3-*O*-sulfotransferases (HS2ST, HS6ST, HS3ST). Enzymatic modifications of the HS backbone are not systematic, which leads to the occurrence of domains of relatively high IdoUA content and sulfate density (termed S-domains), bound by short transition zones with intermediate sulfation patterns and separated by *N*-acetylated domains. Importantly, NDSTs, HS6STs and HS3STs are represented by distinct isozymes, which are differently expressed depending on cell type and tissue environment. Thus, human HS3STs are represented by seven isozymes encoded by different genes and possess > 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 described as being dependent on 3-*O*-sulfated HS [5]. HS3ST2, 3A, 3B, 4 and 6 were demonstrated to transfer a sulfate group to the 3-OH position of *N*-sulfated GlcN (GlcNS) residue that is linked to an adjacent upstream 2-*O*-sulfated IdoUA. These isozymes, which are called “gD-type” HS3STs, were described to provide the HS-binding site for the glycoprotein gD of type I herpes simplex virus (HSV-1) and to assist viral entry. In contrast, HS3ST1 transfers a sulfate group to the 3-OH position of GlcNS residue that is linked to a non-sulfated GlcUA residue at the non-reducing side, while HS3ST5 exhibits a broader substrate specificity. Both isozymes are involved in the generation of anticoagulant-active HS/heparin domains, as they participate in the synthesis of the binding site for antithrombin-III [5–11].

In the current scheme of HS biosynthesis, the enzymatic machinery is considered to be resident of the Golgi apparatus. A number of previous studies have indeed suggested that HS-modifying enzymes may be gathered into macromolecular complexes termed GAGosome, in which they work in close proximity of each other. 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 [12]. Physical association between C5-epimerase and HS2ST in the Golgi apparatus has also been reported. This interaction may play a functional role in chain modification by ensuring rapid and complete 2-*O*-sulfation of nascent IdoUA residues [13]. The subcellular localization of HS6STs was investigated by using fluorescently 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 [14]. To date, the subcellular localization of HS3STs has not been yet specified, even though these enzymes represent the largest family among HS sulfotransferases.

HS3ST2 and HS3ST3B were reported to catalyse the same reaction of 3-*O*-sulfation *in vitro* and to provide the HS binding sites for HSV-1 [5–9]. In recent works, we demonstrated that both isozymes are differently expressed in monocytes and macrophages depending on the inflammatory environment [15,16]. In contrast to HS3ST3B, HS3ST2 is highly expressed in non-activated macrophages. A highest expression was observed as a consequence of alternative stimulation (M2 polarization), while the enzyme was not detected in pro-inflammatory macrophages (M1) and primary monocytes. Conversely, HS3ST3B was strongly induced in lipopolysaccharide-activated monocytes and M1 macrophages, indicating that it can be upregulated by pro-inflammatory stimuli. The differential expression of HS3ST2 and HS3ST3B in monocytes/macrophages led us to suggest that both isozymes may be involved in the synthesis of 3-*O*-sulfated HS with distinct functions.

On the assumption that different localization may affect their activity, we examined here the subcellular distribution of HS3ST2 and HS3ST3B by using overexpression systems in HeLa cells. To examine whether the catalytic site of both HS3STs may affect their localization, we also constructed mutated forms that have been deleted of this domain (Acat forms). Following transfection in HeLa cells, we found that

HS3ST3B was strictly confined to the Golgi apparatus, while HS3ST2 displayed an unexpected localization in the plasma membrane. We also found that HS3ST2 partially co-localized with syndecan-2, which suggests that the proteoglycan is required to address the isozyme outside of the Golgi apparatus. Finally, we confirmed that endogenous HS3ST2 co-localized with syndecan-2 in the cell membrane of primary macrophages. Collectively, our results suggest that HS3ST3B is probably fully involved in the reaction of HS 3-*O*-sulfation in the Golgi apparatus, while HS3ST2 may also participate, at least in part, in other processes that occur at the plasma membrane.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Rabbit antibodies to HS3ST2 and HS3ST3B were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Mouse antibodies to syndecan-2 (clone H-7), syndecan-4 (clone 5G9) and GAPDH were purchased from Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antibodies to Golgi matrix protein GM130 and to calnexin were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Secondary antibodies conjugated to Alexa-488 and Alexa-568 were from Thermo Fisher Scientific. Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Recombinant HSV-1 gD protein was from Antibodies-online (Aachen, Germany). Mouse antibody to HSV-1 gD (clone 1.3) was obtained from Abcam (Cambridge, UK). Other chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise specified.

2.2. Isolation of human monocytes 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 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 (FCS) and 10 ng/mL M-CSF (PeproTech, Rocky Hill City, NJ, USA). Experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject (EFS, NT/18/2015/092). The 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).

Human epithelial-like cervical tumor cell line HeLa (ATCC CCL-2) and human embryonic kidney-293 cell line HEK-293 (ATCC CRL-1573) were 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.

2.3. 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-PCR (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'-CTCGTCAATTC CAGGAGGA-3' (reverse); syndecan-2 (NM_002998.3), 5'-CTGCTCAA AAGTGGAAACC-3' (forward) and 5'-TGGGTCCATTTCTTCTTG-3' (reverse); syndecan-3 (NM_014654.3), 5'-ACCCEAACTCCAGAGAC CTT-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), as described in [17]. The transcript of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (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. 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 analysis.

2.4. Construction of expression plasmids

The encoding region of human *HS3ST2* (NM_006043) was isolated from cDNA of primary macrophages, while the encoding region for *HS3ST3B* (NM_006041) was obtained from the fibroblast MRC-5 SV2 cell line [15,16]. Each cDNA was amplified by PCR with specific forward and reverse primers (Table 1) and DynaZyme DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), as described by the manufacturer. PCR fragments were generated with *EcoRV* and *HindIII* restriction sites at the 5' and 3' ends for *HS3ST2*, and with *XhoI* and *BamHI* restriction sites at the 5' and 3' ends for *HS3ST3B*. After digestion with the appropriate restriction enzymes, fragments were inserted in pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific) to express untagged proteins. For the construction of fluorescent probes, full length cDNAs and truncated sequences encoding the cytoplasmic, transmembrane and stem regions of each enzyme were generated with *NheI* restriction sites at the 5' end and *HindIII* at the 3' end. Fragments were inserted in pcDNA3.1 upstream a sequence coding for monomeric red fluorescent protein-1 (RFP) to express tagged proteins. Schematic diagrams of *HS3ST2* and *HS3ST3B* and their related constructs are shown in Fig. 1. *HS3ST2*-Δcat-RFP and *HS3ST3B*-Δcat-RFP expressing vectors were constructed in such a way as to cover the entire sequences corresponding to the cytosolic, transmembrane and stem regions of each isozyme. The lengths of each region were deduced from the published amino acid sequences of *HS3ST2* (NP_006034) and *HS3ST3B* (NP_006032) (Fig. S1, Supplementary material).

2.5. Cell transfection of expression plasmids and siRNA

For cell transfection with expression plasmids, HeLa cells were plated at 2×10^5 cells per well (3 mL) and transiently transfected with ADN-lipofectamine 2000 complexes at a ratio 1:4, according to the

Table 1
Sets of primers used for plasmid construction.

Plasmid	Forward (F) and reverse (R) primers
pHS3ST2 WT-RFP	F: 5'-atatgtagcagccaccatggcctatagggtctcctg-3' R: 5'-gcgcaagcttagtcccactggaagtcctgcc-3'
pHS3ST2 Δcat-RFP	F: 5'-atatgtagcagccaccatggcctatagggtctcctg-3' R: 5'-gtacaagcttagcagcttgggtgagccggag-3'
pHS3ST2	F: 5'-atatgatagcagccaccatggcctatagggtctcctgcccgcg-3' R: 5'-gtccaagcttagtcccactggaagtcctgcccaac-3'
pHS3ST3B WT-RFP	F: 5'-atatgtagcagccaccatggggcagcgctgagtgccg-3' R: 5'-gcgcaagcttagatcccagcccaagtcgtgccggtc-3'
pHS3ST3B Δcat-RFP	F: 5'-atatgtagcagccaccatggggcagcgctgagtgccg-3' R: 5'-gcgcaagcttagagaccactgaaaagctggagatgggg-3'
pHS3ST3B	F: 5'-ttaaactcgagatggggcagcgctgagtgccgagatctgctcgat-3' R: 5'-gagcgatcctcaatcccagcccaagtcgtgccggtcctgtagaa-3'

The underlined sequences represent restriction sites for insertion of PCR fragments.

manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). For small-interfering RNA (siRNA)-mediated silencing experiments, HeLa cells and macrophages were plated at 2×10^5 cells per well (3 mL) and 1×10^6 cells per well (1 mL), 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 *HS3ST2* and *syndecan-4* mRNAs were described in [17,18], respectively. A synthetic siRNA duplex corresponding to the sequence of *syndecan-2* mRNA 5'-AAAACUCCAACUAGUGUCdTdT-3' was designed by Sigma-Aldrich. All the siRNAs 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.

2.6. Western immunoblotting and co-immunoprecipitation

HeLa cells (2×10^5 /point) were routinely lysed in 400 μL of Tris buffer (TBS: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6), supplemented with 1% Triton X-100, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF and protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics, Meylan, France) for 30 min 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 adjusted to 30 μL with lysis buffer, mixed with 4× 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 TBS supplemented with 0.05% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) non-fat dry milk powder, and then probed overnight with primary antibodies (1:2000) in TBS supplemented with 5% (w/v) non-fat dry milk powder. After washing, immunoreactive proteins were visualized with peroxidase-conjugated secondary antibodies (1: 20,000) and ECL Detection Kit (Amersham). For co-immunoprecipitation experiments, HeLa cells were lysed in Tris buffer supplemented with 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate and protease inhibitor mixture for 3 h at 4 °C. Thereafter, samples (250 μg of proteins, as determined by BCA assay) were subjected to immuno-precipitation with 2 μg of anti-*HS3ST2* antibody or anti-*syndecan-2* antibody. Anti-*HS3ST2* antibody was reactive towards a region overlapping the stem region, thus allowing the recognition of the full length *HS3ST2* and its truncated form *HS3ST2*-Δcat-RFP. Immune complexes were precipitated using μMACS protein A/G microbeads, according to the instructions of the manufacturer (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Proteins in the cellular extracts (input: 10%) and pulled-down fractions were then analysed by immunoblotting, as described above. Prior immunostaining with anti-*syndecan-2* antibodies, blot was blocked and then incubated with a mixture of heparinases I, II and III (Iduron, Manchester, UK) (10 mU per mL) for 2 h room temperature in order to enhance the antibody reactivity.

2.7. Cell surface biotinylation

Cell surface proteins were biotinylated as described in [19]. Briefly, cells were grown to reach 75–80% confluence on the day of the experiment. After wash with 0.1 M phosphate buffer (PBS: 20 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.2), cells were incubated in the presence of the biotinylation reagent EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (0.5 mg/mL) (Thermo Fischer Scientific) for 30 min in PBS containing 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂. After wash with PBS, cells were quenched for 15 min at 4 °C with PBS containing 100 mM glycine and 0.5% bovine serum albumin (BSA) (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) and then washed with PBS plus 100 mM glycine. They were then incubated in lysis buffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitors, pH 7.2) for 20 min at 4 °C. Following clarification by centrifugation at 10,000 g for 15 min, the supernatant was incubated with

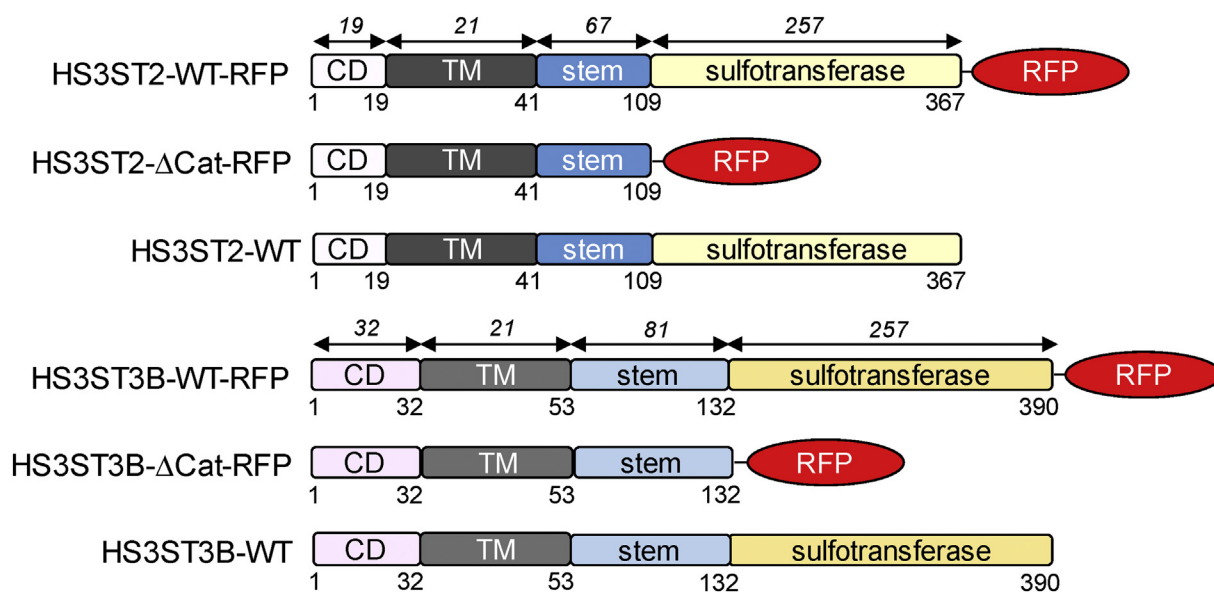


Fig. 1. Schematic diagrams of HS3ST2 and HS3ST3B plasmid constructs used for transfection. The positions of the amino acid residues in the cytoplasmic, transmembrane, stem and sulfotransferase domains are indicated below each construct of HS3ST2 (NP_006034) and HS3ST3B (NP_006032). The number of amino acid residues within each domain is indicated in italic. CD, cytoplasmic domain; Δ cat, deletion; RFP, red fluorescent protein; TM, transmembrane region; WT, wild-type.

30 μ L of streptavidin-agarose beads (Millipore, Molsheim, France) for 4 h at 4 °C. After removal of unbound material (which contains intracellular proteins), the beads were extensively washed with lysis buffer and the biotinylated proteins were eluted by boiling in SDS sample buffer. Proteins were then analysed by SDS-PAGE followed by Western blot.

2.8. Immunofluorescence staining and analysis

Transfected HeLa cells or macrophages were seeded on glass coverslips, washed three times with PBS and then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature. After washing with PBS, cells were permeabilized with 0.1% saponin in PBS for 10 min, and incubated for at least 60 min with a blocking solution containing 0.2% gelatine, 2% BSA and 2% FCS in PBS. Following blocking, cells were incubated for 1 h with primary antibodies to either HS3ST2, syndecans and/or organelle markers (1:100) 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. Detection of HSV-1 gD binding was performed essentially as described in [17], with the following modifications. Briefly, recombinant HSV-1 gD (10 μ g/mL) was first incubated with primary anti-HSV-1 gD antibody (1:100) in blocking buffer for 30 min at 4 °C. The complex was then added to transfected cells and incubated for 30 min at room temperature. After washing, cells were incubated for 1 h with Alexa 488-conjugated secondary antibody, as above. In all cases, cells were stained with 500 ng/mL DAPI (Sigma-Aldrich) for 10 min, in order to visualize cell nuclei. Immunofluorescence was analysed with an inverted Zeiss LSM 780 microscope (Oberkochen, Germany) equipped with a 63 \times oil immersion lens, at room temperature. Data were collected using the Zeiss Zen Pro 2.1 software and processed with Image J software.

2.9. Statistical analysis

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

3. Results

3.1. Subcellular localization of fluorescently tagged HS3ST2 and HS3ST3B

The subcellular localization of human HS3ST2 and HS3ST3B was investigated by using overexpression systems in HeLa cells. We used this cellular model because of the absence of HS3ST2 and the low expression of endogenous HS3ST3B [20]. The expression vectors for RFP-tagged proteins were constructed with either the full-length sequences encoding each enzyme (HS3ST-WT-RFP) or truncated sequences deleted of the catalytic domains (HS3ST- Δ cat-RFP) (Fig. 1). HeLa cells were transiently transfected with the different constructs and the expression of RFP-tagged WT and Δ cat forms of HS3STs was analysed by confocal microscopy. In addition, the precise localization of the fluorescent proteins was delineated by immunofluorescence staining with organelle-specific antibodies labelled with Alexa-488. As shown in Fig. 2A, both HS3ST3B-WT-RFP and HS3ST3B- Δ cat-RFP constructs were similarly localized with GM130. This observation indicates that HS3ST3B is entirely confined within the Golgi apparatus, by a mechanism that does not require the presence of the catalytic domain of the enzyme. In contrast, we found that the truncated and full-length forms of HS3ST2 displayed distinct intracellular staining (Fig. S2A, Supplementary material). In our hands, HS3ST2- Δ cat-RFP co-localized 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 it 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 [21]. On another hand, the RFP tag could have prevented the enzyme to leave the ER compartment. We then analysed the binding of HSV-1 gD protein to test whether RFP-tagged HS3STs were active in producing 3-*O*-sulfated HS in HeLa cells. Transfection of HS3ST3B resulted in the production of 3-*O*-sulfated motifs, as demonstrated by the fluorescent immunostaining of HSV-1 gD at the plasma membrane of HeLa cells (Fig. 2B). In contrast, we did not visualize any fluorescent signal at the surface of HS3ST2-transfected cells, which means that the RFP-tagged enzyme was not capable of modifying its substrate (Fig. S2B, Supplementary material).

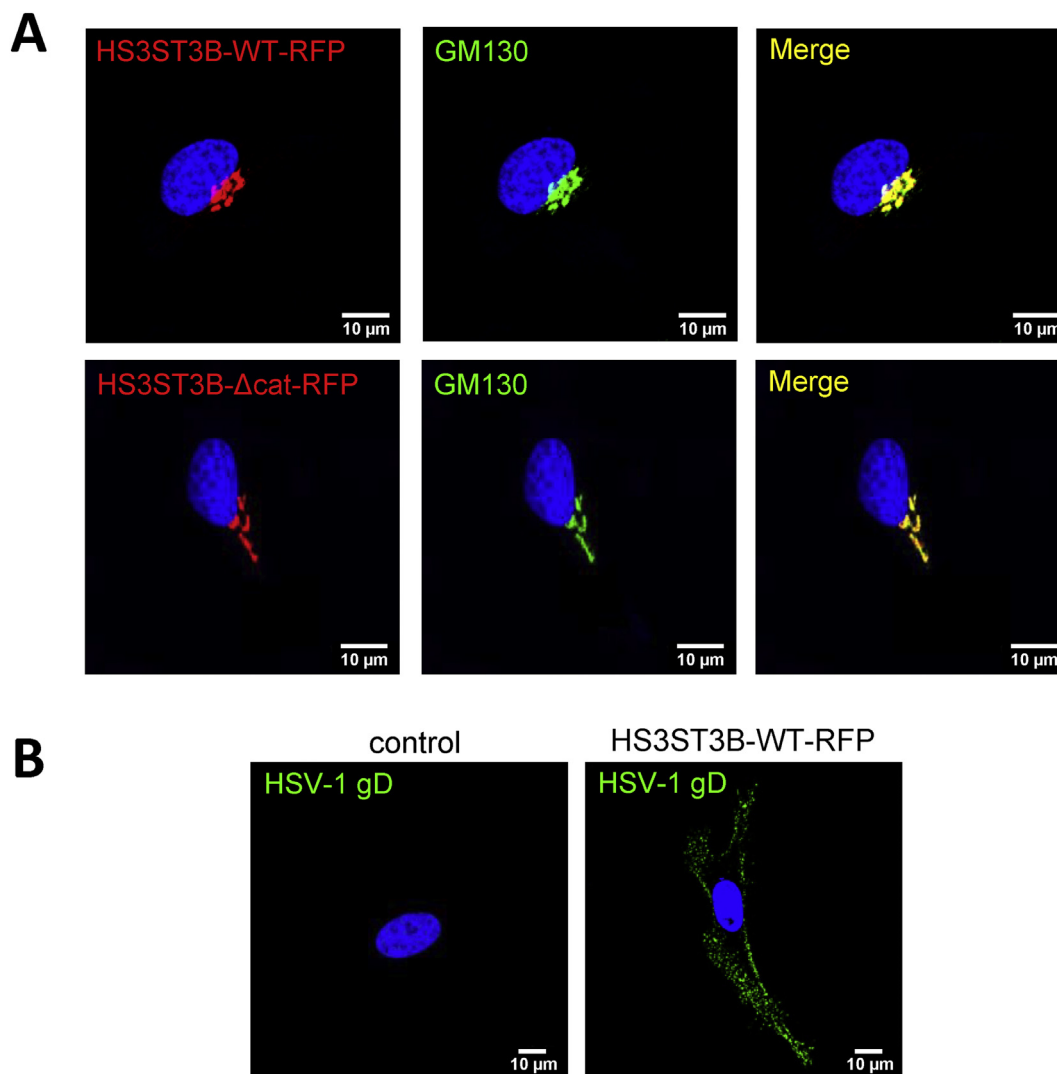


Fig. 2. Subcellular localization of fluorescent forms of HS3ST3B. A: HeLa cells were transiently transfected with expression vectors encoding the RFP tag coupled to full-length (WT) or truncated (Δ cat) forms of HS3ST3B. In parallel, cells were double-labelled with antibodies to GM130 (Golgi marker), and secondary antibody conjugated to Alexa-488 was used to highlight both markers in green. Representative microscopy images of the expression of WT and Δ cat forms of HS3ST3B (left panels) and organelle marker (middle panels) are shown in red and green fluorescence, respectively. Right panels show merged images (number of separate experiments, $N = 3$; number of analysed cells per slide, $n = 30$). B: Surface binding of recombinant HSV-1 gD to HeLa cells. HS3ST3B-transfected cells were incubated with recombinant HSV-1 gD (10 μ g/mL) and anti-gD antibody. After 1 h of incubation, HSV-1 gD binding was detected with a secondary antibody conjugated to Alexa-488. Control was obtained with non-transfected HeLa cells. In all experiments, nuclei were stained in blue with DAPI. Scale bar = 10 μ m.

3.2. Overexpression of HS3ST2 in HeLa cells

To overcome the problem of RFP-tagged HS3ST2 retention in ER compartment, we decided to transfect HeLa cells with an expression vector encoding a non-tagged form of the enzyme. First, we confirmed that recombinant HS3ST2 was expressed in transfected cells by Western blot. Anti-HS3ST2 antibody specifically reacted with immunoreactive protein, for which the average molecular weight was 45–55 kDa (Fig. 3A). 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. We also checked that transfection with the plasmid encoding non-tagged HS3ST2 resulted in the production of 3-*O*-sulfated HS. As shown in Fig. 3B, HS3ST2-transfected HeLa cells were indeed capable of interacting with HSV-1 gD protein, which means that the enzyme was produced in an active form. To analyse the subcellular localization of HS3ST2, transfected HeLa cells were fixed, permeabilized and incubated with anti-HS3ST2 antibody. Thereafter, cells were incubated with secondary antibody conjugated to Alexa-568 and the fluorescence signal was

analysed by confocal microscopy. Surprisingly, the fluorescent immunostaining of non-tagged HS3ST2 did not co-localize with GM-130. In contrast, it was rather visualized in the vicinity of the plasma membrane of HeLa cells, which suggests that HS3ST2 was addressed outside of the Golgi apparatus (Fig. 3C). To know whether it could be expressed at the outer side of the plasma membrane, we performed surface protein biotinylation experiments. HeLa cells were transfected with non-tagged forms of either HS3ST2 or HS3ST3B and then exposed to a biotinylation reagent for labelling cell surface proteins. Thereafter, intracellular (non-biotinylated) and cell surface (biotinylated) proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blot with antibodies to HS3ST2 or HS3ST3B. As shown in Fig. 3D, HS3ST2 was only immunostained in the biotinylated fraction, meaning that it was expressed at the cell surface. In contrast, HS3ST3B was visualized in the intracellular fraction, confirming its retention inside the cell.

Collectively, these first results revealed that both HS3ST isozymes display quite distinct subcellular localizations: HS3ST3B is a Golgi-resident enzyme, which was expected for an enzyme involved in HS biosynthesis; in contrast, HS3ST2 is addressed outside of the Golgi

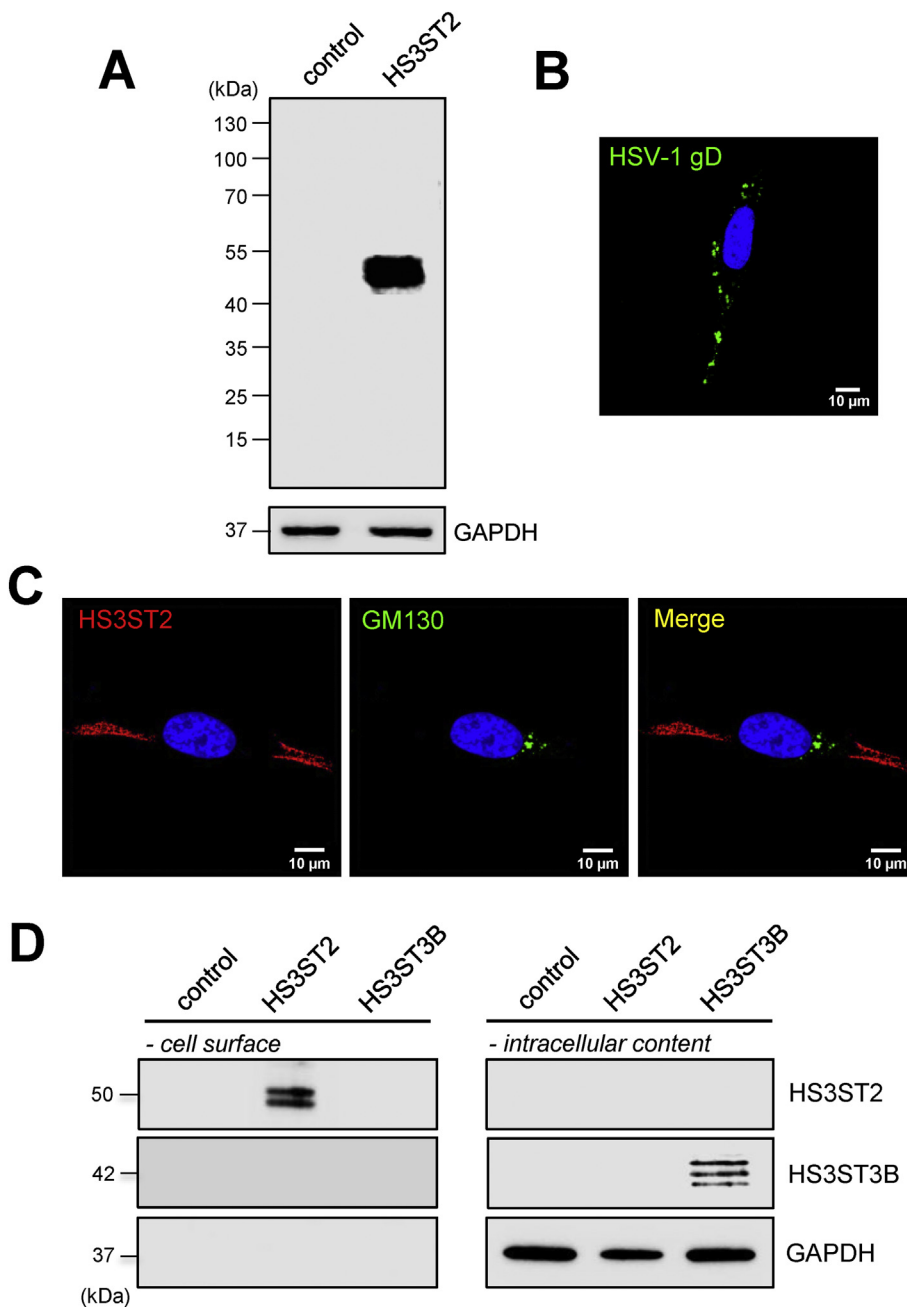


Fig. 3. Subcellular localization of non-tagged HS3ST2 in HeLa cells. **A:** HeLa cells were transiently transfected with expression vectors encoding non-tagged form of full-length HS3ST2. The expression of the enzyme was verified by Western blot with specific antibody to HS3ST2. Parallel immunoblotting with anti-GAPDH confirmed equal loading of the samples. **B:** Surface binding of recombinant HSV-1 gD to HS3ST2-transfected HeLa cells. Following incubation with HSV-1 gD and anti-gD antibody, cells were fluorescently stained with Alexa-488-conjugated antibody. **C:** For analysis of the subcellular localization of HS3ST2, transfected HeLa cells were fixed, permeabilized and then incubated in the presence of anti-HS3ST2 and anti-GM130 antibodies. Thereafter cells were immunostained with secondary antibodies conjugated to Alexa-488 and Alexa-568, in order to highlight the Golgi marker and the enzyme in green and red fluorescence, respectively. Nuclei were stained in blue with DAPI. Right panel shows merged image. ($N = 3$ separate experiments; $n = 30$ cells). Scale bar = 10 μ m. **D:** For cell surface biotinylation experiments, HeLa cells were transfected with expression vectors encoding non-tagged forms of full-length HS3ST2 or HS3ST3B. Samples were then prepared as described in Materials and Methods and subjected to SDS-PAGE and Western blot with the indicated antibodies. Data are representative of three independent experiments.

apparatus and accumulates at the plasma membrane. Interestingly, the truncated form of HS3ST2 was localized in the Golgi apparatus, which suggests that the catalytic domain may support the membrane localization of this isozyme.

3.3. Subcellular localization of HS3ST2 with syndecans

In next experiments, we hypothesized that the localization of HS3ST2 in the plasma membrane may be due to interaction with an HS proteoglycan, and more precisely with a member of the syndecan family. Actually, syndecan-2 and -4 were reported to display a similar high expression in HeLa cells and macrophages [22,23]. Thus, we examined whether HS3ST2 shared a common localization with one of these proteoglycans. Following transfection with the expression vector encoding the non-tagged form of HS3ST2, cells were permeabilized and then incubated with antibodies to HS3ST2 and to syndecan-2 or -4. Reactive proteins were fluorescently stained with secondary antibodies

conjugated to Alexa-568 and Alexa-488, respectively. Interestingly, we found that the fluorescent staining of HS3ST2 and syndecan-2 merged in some areas of the plasma membrane, which revealed a partial colocalization of the isozyme with this proteoglycan. In contrast, we did not observe any overlapping between the fluorescence signals of HS3ST2 and syndecan-4 (Fig. 4A). Thus, the findings that HS3ST2 colocalized with syndecan-2 suggest that the proteoglycan may take part to the unexpected membrane localization of the enzyme.

We then investigated the association of HS3ST2 with syndecan-2 by co-immunoprecipitation experiments (Fig. 4B). To this end, HeLa cells were transfected with the vectors encoding full-length HS3ST2 or its truncated form HS3ST2- Δ cat-RFP. As expected, we found that the enzyme was specifically detected with anti-HS3ST2 antibody in the input fraction of cells transfected with HS3ST2-WT expression vector. An immunoreactive band at \sim 38 kDa was detected in the lysate of cells transfected with the plasmid encoding HS3ST2- Δ cat-RFP. The size of the immunoreactive protein corresponded to the expected molecular

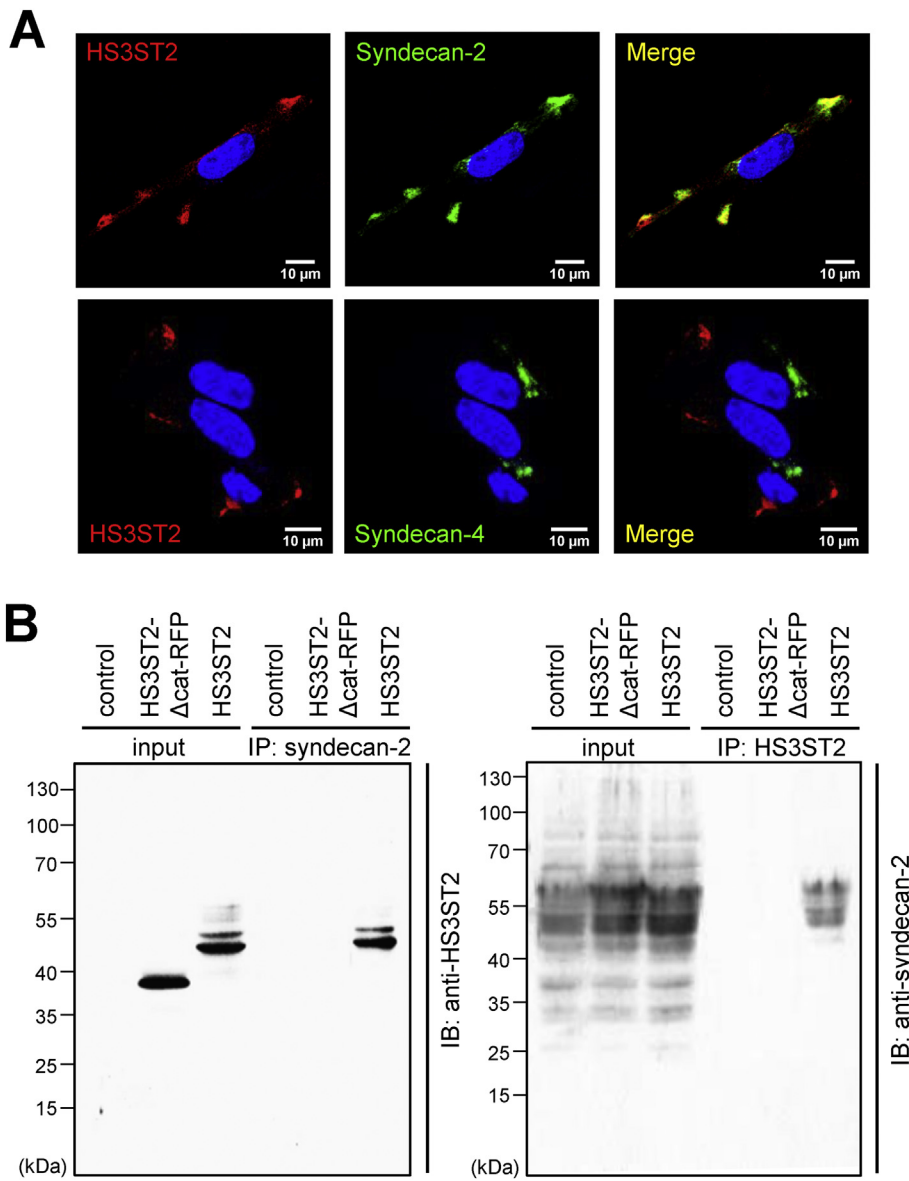


Fig. 4. Co-localization of HS3ST2 with syndecan-2. **A:** HeLa cells were transiently transfected with the expression vector encoding HS3ST2 for 24 h, after which time they were permeabilized for immunofluorescence analysis of HS3ST2 and endogenously expressed syndecan-2 or -4. HS3ST2 and immunoreactive syndecans were fluorescently stained with secondary antibodies conjugated to Alexa-568 and to Alexa-488, respectively. Nuclei were stained in blue with DAPI. Representative microscopy images of the expression of HS3ST2 (left panels) and syndecans (middle panels) are shown in red and green fluorescence, respectively. Right panels show merged images ($N = 3$ separate experiments; $n = 30$ cells). Scale bar = 10 μm . **B:** For co-immunoprecipitation (IP) experiments, HeLa were transfected with plasmids encoding full-length HS3ST2 or HS3ST2- Δcat -RFP for 24 h, after which time they were collected and lysed for co-IP assays. Samples from the IP performed with anti-syndecan-2 antibody were analysed by immunoblotting (IB) with anti-HS3ST2 antibody (left panel), and in reverse experiments, samples from the IP performed with anti-HS3ST2 antibody were analysed by IB with anti-syndecan-2 antibody (right panel). The levels of expression of full-length HS3ST2, HS3ST2- Δcat -RFP and syndecan-2 were directly analysed in input fractions (10%) by Western blot with the indicated antibodies. Data are representative of three independent experiments.

weight of the truncated form of the enzyme fused to RFP tag, which confirmed that anti-HS3ST2 antibody was also reactive towards the enzyme depleted of its catalytic domain. Following immunoprecipitation of cell lysates with anti-syndecan-2 antibody and immunoblotting of the precipitated fractions with anti-HS3ST2 antibody, we found that only full-length HS3ST2 was pulled down with the proteoglycan (Fig. 4B, left panel). In the reverse experiments, co-immunoprecipitation was carried out with anti-HS3ST2 antibody (Fig. 4B, right panel). As already described, direct immunostaining with anti-syndecan-2 antibodies resulted in the detection of different bands in the input fractions [22–26]. Following immunoprecipitation with anti-HS3ST2 antibody, we found that a fraction of syndecan-2 was pulled down only in the cell lysate containing full-length HS3ST2. The anti-HS3ST2 antibody was indeed unable to co-precipitate the proteoglycan in the lysate of cells transfected with the plasmid encoding HS3ST2- Δcat -RFP. Together, these results indicated that HS3ST2 was associated with syndecan-2 via a mechanism involving the catalytic domain of the enzyme.

In contrast to HeLa cells, non-tumor epithelial cells express very low or non-detectable levels of syndecan-2 and -4 [22–26]. Interestingly, we found that transfection of HS3ST2 in cells of the immortalized HEK-293 cell line did not result in the localization of the enzyme in the plasma membrane. We rather observed a partial co-localization with GM130,

which indicates that it was mainly retained in the Golgi apparatus (Supplementary Fig. S3). Given that syndecan-2 is weakly expressed in HEK-293 cells, these findings support the idea that high expression of the proteoglycan is required for the membrane localization of HS3ST2. To decipher the functional relationships between both molecules, we decided to silence the expression of syndecan-2 and -4 by RNA interference. Treatment of HeLa cells with specific siRNA targeting these proteoglycans resulted in a significant down-regulation of the corresponding mRNA. After 24 h of transfection, the inhibitory effects of siRNAs were estimated at 82% and 89% respectively, when compared to the results obtained with the negative control siRNA (Supplementary Fig. S4). Moreover, 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 siRNAs used in this study. We next examined the cellular localization of HS3ST2 in siRNA-treated HeLa cells. To this end, HeLa cells were first treated with specific siRNA for 24 h and then transfected with non-tagged HS3ST2. Thereafter, the subcellular localization of the enzyme was analysed by confocal microscopy (Fig. 5A). As expected, cell treatment with the negative control siRNA did not hamper the subcellular localization of HS3ST2. The localization of the enzyme was also unmodified in cells that were deficient in the expression of syndecan-4.

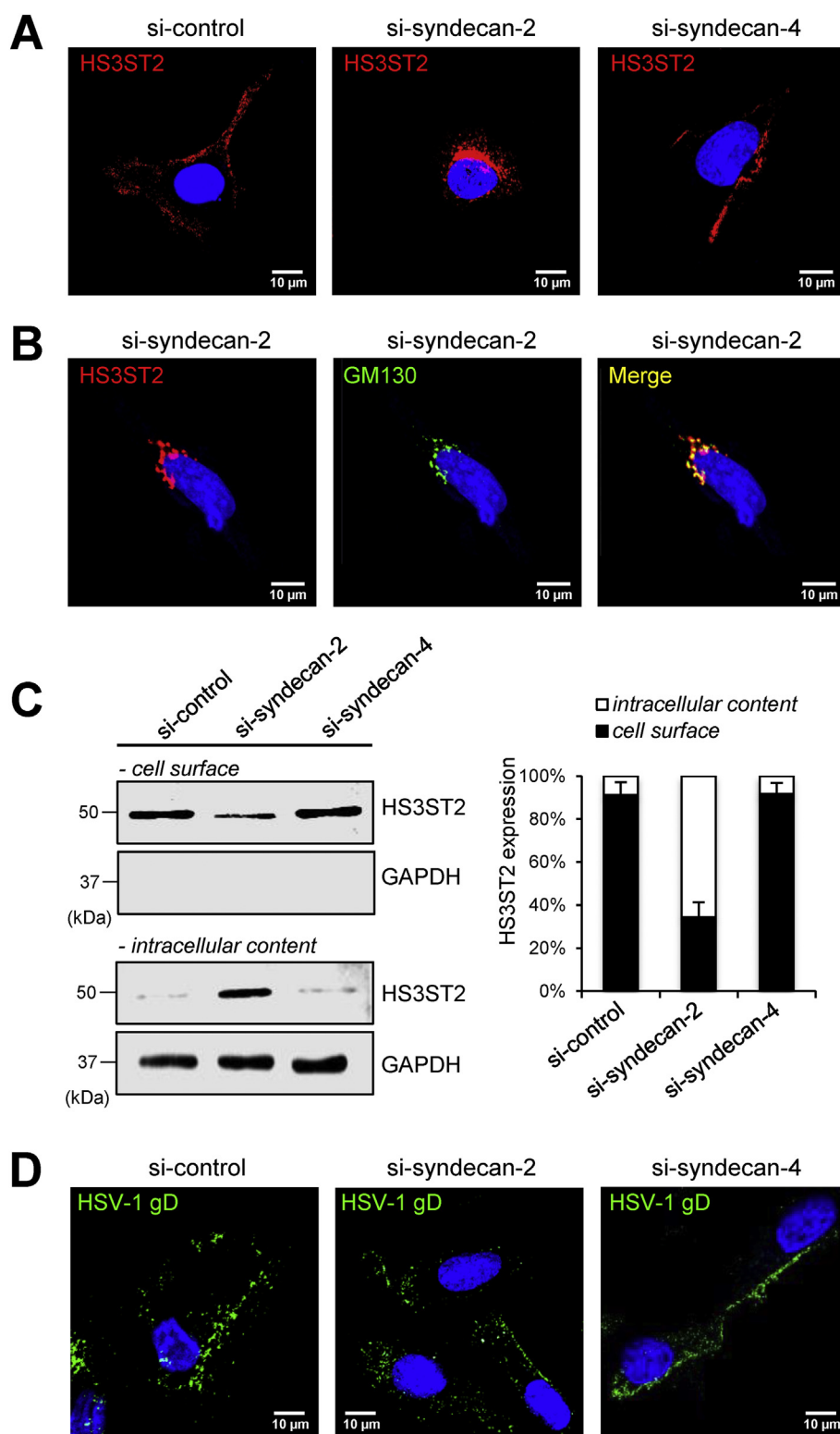


Fig. 5. Localization of HS3ST2 in syndecan-deficient HeLa cells. **A:** HeLa cells were transfected with negative control siRNA (si-control) or specific siRNA targeting either syndecan-2 (si-syndecan-2) or -4 (si-syndecan-4). After 24 h of treatment, cells were transiently transfected with plasmid encoding HS3ST2. The expression of HS3ST2 was detected with specific antibody and fluorescently stained with secondary antibody conjugated to Alexa-568. Nuclei were stained in blue with DAPI. Representative microscopy images of the expression of HS3ST2 are shown in red fluorescence ($N = 3$ separate experiments; $n = 30$ cells). Scale bar = 10 μm. **B:** HeLa cells were treated with si-control or si-syndecan-2 siRNAs for 24 h, after which time they were transfected with plasmid encoding HS3ST2. They were then double-labelled with antibodies to GM130 and HS3ST2, followed by incubation with secondary antibodies conjugated to Alexa-488 and Alexa-568, in order to highlight the Golgi marker and the enzyme in green and red fluorescence, respectively. Nuclei were stained in blue with DAPI. Right panel shows merged image ($N = 3$ separate experiments; $n = 30$ cells). Scale bar = 10 μm. **C:** HeLa cells were treated with si-control or specific siRNAs to syndecan-2 or syndecan-4 for 24 h. Following surface protein biotinylation, HS3ST2-transfected cells were subjected to SDS-PAGE and Western blot with the indicated antibodies. Right panel shows the quantification of HS3ST2 levels after normalization with GAPDH ($N = 3$ separate experiments). **D:** Surface binding of recombinant HSV-1 gD to siRNA-treated HeLa cells. HS3ST2-transfected cells were incubated with recombinant HSV-1 gD (10 μg/mL) and anti-gD antibody. After 1 h of incubation, HSV-1 gD binding was detected with a secondary antibody conjugated to Alexa-488. Control was obtained with non-transfected HeLa cells. In all experiments, nuclei were stained in blue with DAPI. Scale bar = 10 μm.

In contrast, 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 intracellularly. Moreover, we found that HS3ST2 co-localized with GM130, indicating that it was retained in the Golgi apparatus in the absence of syndecan-2 (Fig. 5B). In order to confirm that syndecan-2 is required to address HS3ST2 to the plasma membrane, we reproduced surface protein biotinylation experiments

with siRNA-treated cells. As expected, cell treatment with the negative control siRNA or anti-syndecan-4 siRNA did not modify the localization of HS3ST2, which was detected in the biotinylated fractions. In contrast, silencing the expression of syndecan-2 strongly reduced the immunostaining of biotin-labelled cell surface HS3ST2. The enzyme was instead recovered in the intracellular fraction, which confirmed that it was no more addressed to the cell surface (Fig. 5C). In our first experiments, we checked that HS3ST2 was produced in an active form in

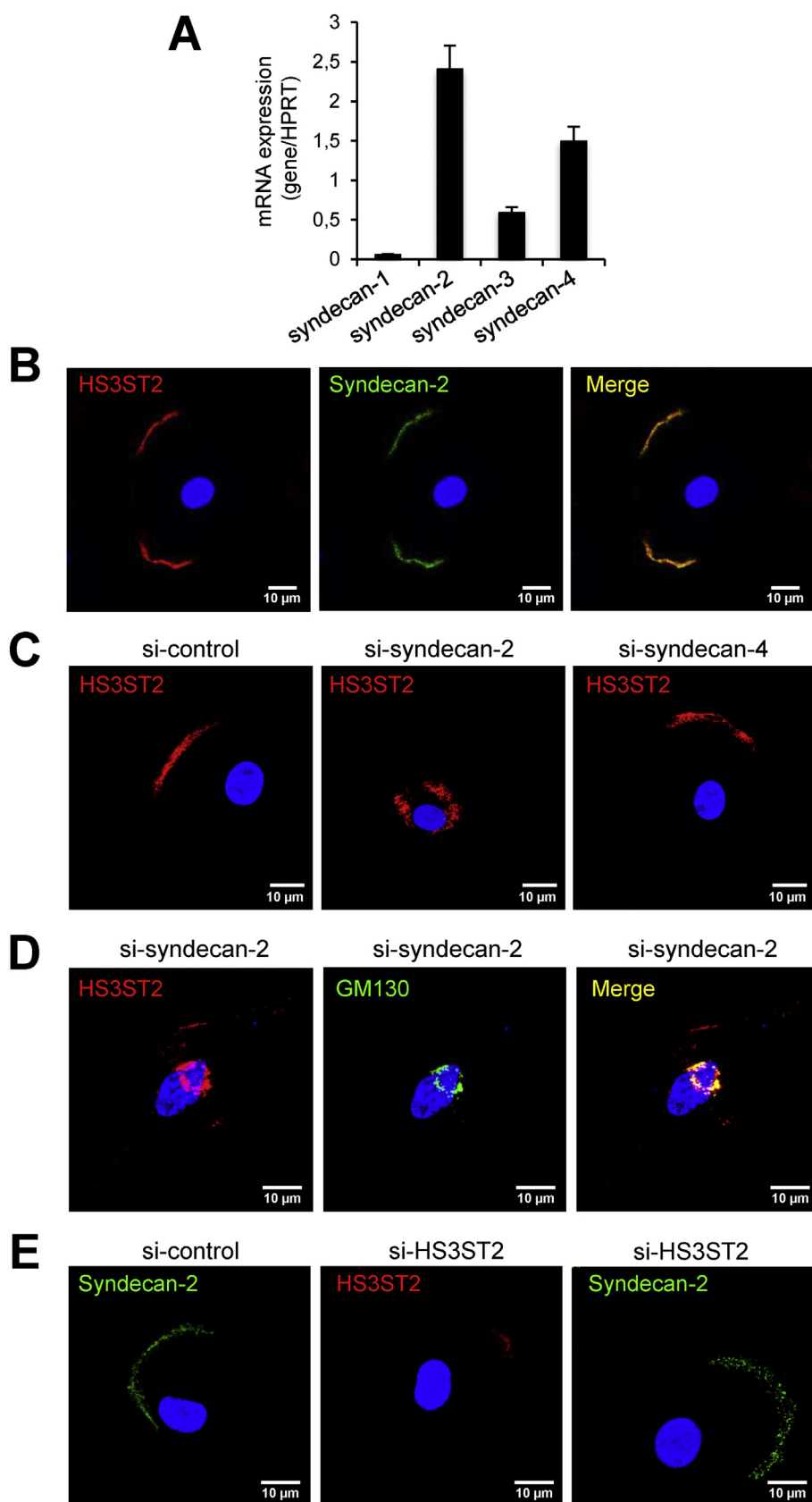


Fig. 6. Co-localization of HS3ST2 with syndecan-2 in primary macrophages. **A:** The endogenous expression of syndecans was analysed by RT-qPCR. Following reverse transcription of RNA extracted from primary macrophages, the level of mRNA for the four syndecans was quantified by RT-qPCR. Relative transcript abundance was normalized to HPRT mRNA. Data are means \pm S.D. and were obtained with macrophages from six different donors. **B:** Co-localization of endogenous HS3ST2 and syndecan-2 in macrophages was analysed 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 antibody and Alexa 488-conjugated anti-mouse antibody. 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 co-localization. **C:** HS3ST2 localization in syndecan-2-deficient macrophages was analysed 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 antibody and fluorescently stained with secondary antibody conjugated to Alexa-568. Nuclei were stained in blue with DAPI. Representative microscopy images of the expression of HS3ST2 are shown in red fluorescence. **D:** In parallel, macrophages were treated with si-control or si-syndecan-2 siRNAs, after which they were double-labelled with antibodies to GM130 and HS3ST2, followed by incubation with secondary antibodies conjugated to Alexa-488 (green) and Alexa-568 (red), respectively. Right panel show merged image ($N = 3$ separate experiments; $n = 30$ cells). Scale bar = 10 μ m. **E:** Syndecan-2 localization in HS3ST2-deficient macrophages was analysed by confocal microscopy. Following treatment of macrophages with negative control siRNA (si-control) or specific siRNA targeting HS3ST2 (si-HS3ST2), syndecan-2 and HS3ST2 was detected with specific antibodies and fluorescently stained with secondary antibodies conjugated to Alexa-488 (green) or Alexa-568 (red). DAPI staining was performed to show the nucleus. Representative microscopy images of the expression of syndecan-2 are shown in green fluorescence ($N = 3$ separate experiments; $n = 30$ cells). Scale bar = 10 μ m.

HeLa cells, as it was capable of producing 3-*O*-sulfated HS with binding properties for HSV-1 gD protein. Thus, we tested whether silencing the expression of syndecan-2 could have altered the enzymatic activity of HS3ST2. As shown in Fig. 5D, siRNA-treated HeLa cells were still

capable of interacting with HSV-1 gD protein, which means that HS3ST2 was still enzymatically active even though it was retained in the Golgi apparatus. Collectively, these results support a model in which syndecan-2 may participate in the trafficking and consequent

localization of HS3ST2 in the plasma membrane.

3.4. Localization of endogenous HS3ST2 and syndecan-2 in primary macrophages

We previously reported that primary macrophages express high level of HS3ST2 [15]. 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 confirmed by real-time RT-PCR that syndecan-2 and -4 were the main representative members of this proteoglycan family in primary macrophages (Fig. 6A). Thereafter, we analysed the localization of endogenous HS3ST2 and syndecan-2 by immunofluorescence. To this end, permeabilized macrophages were incubated with antibodies to HS3ST2 and to syndecan-2, after which fluorescent staining was performed by using secondary antibodies conjugated to Alexa-568 and Alexa-488, respectively. As shown in Fig. 6B, we found that the fluorescent staining of HS3ST2 was confined to the plasma membrane of macrophages, which was in agreement with the localization observed in our model of HS3ST2 expression in HeLa cells. Moreover, 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 siRNAs to syndecan-2 and -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 (Fig. 6C). As expected, we found that it was mainly co-localized with GM130, thus confirming that HS3ST2 remained within the Golgi apparatus in the absence of syndecan-2 (Fig. 6D). In order to check whether a mutual effect may exist, the subcellular localization of syndecan-2 was analysed in HS3ST2-deficient cells (Fig. 6E). As expected, specific siRNA to HS3ST2 efficiently reduced the expression of the enzyme, as demonstrated by the strong decrease in the fluorescent signal observed with anti-HS3ST2 antibody. Silencing the expression of HS3ST2 had however no notable effect on the subcellular localization of syndecan-2, which indicates that the distribution of the proteoglycan was not dependent on its association with the isozyme. Collectively, these results lend support for the hypothesis that syndecan-2 is required for the trafficking and consequent localization of HS3ST2 in the plasma membrane.

4. 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. Depending on cell type and tissue environment, the differential expression of these enzymes is likely to control the synthesis of HS motifs with distinct structural features and functions. HS3ST2 and HS3ST3B were reported to catalyse the same reaction of 3-O-sulfation *in vitro* by transferring a sulfate group to the 3-OH position of GlcNS adjacent to IdoUA2S residues. With HS3ST3A, HS3ST4 and HS3ST6, they are often referred to as gD-type HS3STs, given that they provide HS binding sites for the glycoprotein gD of HSV-1 [5–9]. Nevertheless, the diversification of HS3ST subfamily suggests that there might have distinct substrate specificity *in*

vivo. While HS3ST2 and HS3ST3B shared > 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 favour of specific subcellular localization and consequent interactions with distinct partners, which may argue for distinct substrate specificity *in vivo*.

In the current work, we have examined the subcellular localization of HS3ST2 and HS3ST3B by using expression vectors encoding fluorescent forms of each isozyme. We found that RFP-tagged HS3ST3B is localized in the Golgi apparatus, which is consistent with that is known for other enzymes involved in HS biosynthesis. Moreover, we demonstrated that transfected cells were capable of interacting with HSV-1 gD protein, which confirmed that HS3ST3B was capable of synthesizing 3-O-sulfated HS. Co-localization with Golgi marker revealed that full-length and truncated constructs were both confined in this compartment, which indicates that the catalytic domain of the HS3ST3B is not important for the mechanism of Golgi 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 and/or luminal stem domains [27]. In this way, protein oligomerization *via* the stem regions has been already described for HS6STs within the Golgi [14]. In the same way, HS3ST3B could associate with other 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.

In contrast to HS3ST3B, we found that the RFP-tagged constructs of HS3ST2 were not localized in the same compartment. While the truncated form was addressed to the Golgi apparatus, the full-length RFP-tagged enzyme remained in the ER. These observations suggested that the RFP tag could have prevented the enzyme to leave the ER compartment and/or have led to its retention under a misfolded form [21]. In line with these assumptions, we found that transfected cells were not capable of interacting with HSV-1 gD protein, meaning that HS3ST2-WT-RFP was not capable of modifying its substrate. Like the other gD-type HS3STs, HS3ST2 was indeed demonstrated to transfer a sulfate group to GlcNS residue linked to a 2-O-sulfated IdoUA [5,6]. Because N-sulfation and C5-epimerization occur in the Golgi apparatus, ER retention could have prevented the RFP-tagged enzyme to encounter its substrate. 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 immunofluorescent staining. By using this approach, we obtained transfected cells expressing an active form of HS3ST2, as demonstrated by the binding of HSV-1 gD protein. However, we found an unexpected localization of the isozyme in the plasma membrane. That the truncated form of HS3ST2 did not share the same localization but was retained in the Golgi compartment indicates that the sulfotransferase catalytic domain is probably required for the unconventional localization of the full-length enzyme. On the assumption that HS may participate in addressing HS3ST2 outside of the Golgi, we compared the localization of the isozyme with that of syndecans. Unlike syndecan-4, membrane staining of syndecan-2 was found to overlap with that of HS3ST2, suggesting a co-localization of both molecules in the cell membrane. We also demonstrated by co-immunoprecipitation assays that HS3ST2 was indeed associated with syndecan-2. These findings indicate that both partners may interact directly or *via* bridging molecules in a complex at the plasma surface. Finally, we showed that silencing the expression of the proteoglycan resulted in a loss of the membrane localization of HS3ST2 and its consequent accumulation intracellularly. These results suggest that syndecan-2 is required for addressing HS3ST2 to the plasma membrane. Since exportation outside of the Golgi apparatus appeared dependent on the sulfotransferase catalytic domain of HS3ST2, it may be speculated a trapping mechanism by syndecan-2. *Via* interaction with HS moieties, the proteoglycan could drive a directional transport of HS3ST2 from the Golgi to the cell surface. Further investigations are currently in progress to decipher the molecular interactions between

HS3ST2 and syndecan-2, and to define whether both partners are directly interacting with each other or parts of a larger complex that is addressed to the plasma membrane.

Several studies have used overexpression systems to demonstrate the Golgi localization of enzymes involved in HS biosynthesis, including EXT1, EXT2, C5-epimerase, HS2ST, HS6STs [12–14]. Thus, the finding that HS3ST2 is addressed outside of the Golgi apparatus to the plasma membrane was unexpected. However, such an unconventional localization of an HS-modifying enzyme could be an adverse consequence of the expression system in HeLa cells. We then analysed the localization of endogenous HS3ST2 in macrophages, as we previously reported that the enzyme was expressed at high level within these cells [15]. We found that the localization of HS3ST2 in macrophages resembled that observed in HeLa cells, which excludes the possibility that non-conventional localization of HS3ST2 could be an artefact. Moreover, we found that the enzyme co-localized with syndecan-2 at the membrane of macrophages. As observed in HeLa cells, silencing the expression of the proteoglycan altered the localization but not the enzymatic activity of HS3ST2, which confirmed their functional association. Although surprising, such a non-conventional localization of an enzyme expected to be Golgi-resident has been already reported for some glycosyltransferases, including β 1,4-galactosyltransferase and EXTL3 (exostosin tumor-like 3). 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 neighbouring cells in a lectin-like fashion [28,29]. On another hand, EXTL3 was reported to act as a receptor for Reg (regenerating gene) proteins in pancreatic β -cell regeneration and neurite outgrowth [30,31]. EXTL3 is normally a Golgi-resident glycosyltransferase, which plays a critical role in the initiation of HS biosynthesis. Interestingly, the enzyme was found to be co-localized with Reg-1 α at the membrane of cells of neuronal cell lines and in rat primary neurons. Overexpression of EXTL3 increases the effect of Reg-1 α on neurite outgrowth, while its down-regulation had the opposite effect. These findings suggest that EXTL3 may act a functional receptor at the plasma membrane of neuronal cells [31]. 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 HS3ST2 displays a non-conventional subcellular localization, with an unexpected addressing outside of the Golgi apparatus. In our previous works, we reported that macrophage polarization modifies the profiles of expression of numerous HS sulfotransferases. A striking difference between M1 and M2 macrophage subtypes was observed within the expression of HS3ST2 and HS3ST3B. While HS3ST2 is highly expressed in M2 macrophages, it is rapidly repressed upon M1 polarization. In contrast, HS3ST3B is strongly induced in M1 macrophages by inflammatory stimuli [15]. Because the structure of HS is mainly the consequence of the specific expression and activity of sulfotransferases, the differential expression and distinct localization of HS3ST2 and HS3ST3B suggest that these isozymes may be involved in different functions depending on tissue environment.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Lille and by the Centre

National de la Recherche Scientifique (CNRS) in the framework of the GDR GAG (GDR 3739). We are grateful to Sven Potelle and Kenji Uchimura for helpful discussion.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.013>.

References

- [1] J.D. Esko, S.B. Selleck, Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate, *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002) 435–471.
- [2] S. Sarrazin, W.C. Lamanna, J.D. Esko, Heparan sulfate proteoglycans, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) (pii: a004952).
- [3] J.R. Couchman, Transmembrane signaling proteoglycans, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26 (2010) 89–114.
- [4] K. Lambaerts, S.A. Wilcox-Adelman, P. Zimmermann, The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans, *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (2009) 662–669.
- [5] B.E. Thacker, D. Xu, R. Lawrence, J.D. Esko, Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function, *Matrix Biol.* 35 (2014) 60–72.
- [6] J. Liu, N.W. Shworak, P. Sinay, J.J. Schwartz, L. Zhang, L.M. Fritze, R.D. Rosenberg, Expression of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase isoforms reveals novel substrate specificities, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 5185–5192.
- [7] C.D. O'Donnell, V. Tiwari, M.J. Oh, D. Shukla, A role for heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread, *Virology* 346 (2006) 452–459.
- [8] D. Shukla, J. Liu, P. Blaiklock, N.W. Shworak, X. Bai, J.D. Esko, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, R.D. Rosenberg, P.G. Spear, A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry, *Cell* 99 (1999) 13–22.
- [9] V. Tiwari, C. O'Donnell, R.J. Copeland, T. Scarlett, J. Liu, D. Shukla, 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 (2007) 1075–1079.
- [10] G. Xia, J. Chen, V. Tiwari, W. Ju, J.P. Li, A. Malmstrom, D. Shukla, J. Liu, 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 (2002) 37912–37919.
- [11] D. Xu, V. Tiwari, G. Xia, C. Clement, D. Shukla, J. Liu, Characterization of heparan sulphate 3-O-sulfotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1, *Biochem. J.* 385 (2005) 451–459.
- [12] C. McCormick, G. Duncan, K.T. Goutsos, F. Tufaro, 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 (2000) 668–673.
- [13] M.A. Pinhal, B. Smith, S. Olson, J. Aikawa, K. Kimata, J.D. Esko, Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 12984–12989.
- [14] N. Nagai, H. Habuchi, J.D. Esko, K. Kimata, Stem domains of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase are required for Golgi localization, oligomer formation and enzyme activity, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 3331–3341.
- [15] P. Martinez, A. Denys, M. Delos, A.S. Sikora, M. Carpentier, S. Julien, J. Pestel, F. Allain, Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans, *Glycobiology* 25 (2015) 502–513.
- [16] A.S. Sikora, M. Delos, P. Martinez, M. Carpentier, F. Allain, A. Denys, Regulation of the expression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by inflammatory stimuli in human monocytes, *J. Cell. Biochem.* 117 (2016) 1529–1542.
- [17] M. Delos, C. Hellec, F. Foulquier, M. Carpentier, F. Allain, A. Denys, Participation of 3-O-sulfated heparan sulfates in the protection of macrophages by herpes simplex virus-1 glycoprotein D and cyclophilin B against apoptosis, *FEBS Open Bio* 7 (2016) 133–148.
- [18] M.F. Baietti, Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, Y. Ivarsson, F. Depoortere, C. Coomans, E. Vermeiren, P. Zimmermann, G. David, Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes, *Nat. Cell Biol.* 14 (2012) 677–685.
- [19] S. Potelle, E. Dulary, L. Climer, S. Duvet, W. Morelle, D. Vicogne, E. Lebedonchel, M. Houdou, C. Spriet, M.A. Krzewinski-Recchi, R. Peanne, A. Klein, G. de Bettignies, P. Morsomme, G. Matthijs, T. Marquardt, V. Lupashin, F. Foulquier, Manganese-induced turnover of TMEM165, *Biochem. J.* 474 (2017) 1481–1493.
- [20] A. Deligny, A. Denys, A. Marcant, A. Melchior, J. Mazurier, T.H. van Kuppevelt, F. Allain, Synthesis of heparan sulfate with cyclophilin B-binding properties is determined by cell type-specific expression of sulfotransferases, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 1701–1715.
- [21] A. Ruggiano, O. Foresti, P. Carvalho, Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond, *J. Cell Biol.* 204 (2014) 869–887.
- [22] S. Brule, V. Friand, A. Sutton, F. Baleux, L. Gattegno, N. Charnaux, Glycosaminoglycans and syndecan-4 are involved in SDF-1/CXCL12-mediated invasion of human epitheloid carcinoma HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 1643–1650.
- [23] M.A. De Francesco, M. Baronio, C. Poesi, HIV-1 p17 matrix protein interacts with heparan sulfate side chain of CD44v3, syndecan-2, and syndecan-4 proteoglycans expressed on human activated CD4+ T cells affecting tumor necrosis factor alpha and interleukin 2 production, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 19541–19548.

- [24] A. Utani, M. Nomizu, H. Matsuura, K. Kato, T. Kobayashi, U. Takeda, S. Aota, P.K. Nielsen, H. Shinkai, A unique sequence of the laminin alpha 3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 28779–28788.
- [25] N.A. Afratis, D. Nikitovic, H.A. Multhaupt, A.D. Theocharis, J.R. Couchman, N.K. Karamanos, Syndecans - key regulators of cell signaling and biological functions, *FEBS J.* 284 (2017) 27–41.
- [26] H. Park, M. Kim, H.J. Kim, Y. Lee, Y. Seo, C.D. Pham, J. Lee, S.J. Byun, M.H. Kwon, Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) function as endocytic receptors for an internalizing anti-nucleic acid antibody, *Sci. Rep.* 7 (2017) 14373.
- [27] D.K. Banfield, Mechanisms of protein retention in the Golgi, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) a005264.
- [28] B.D. Shur, S. Evans, Q. Lu, Cell surface galactosyltransferase: current issues, *Glycoconj. J.* 15 (1998) 537–548.
- [29] X. Sun, Y. Wu, Y. Wang, Q. Xue, X. Cheng, G. Zhang, Y. Zhu, X. Wang, β -1,4-galactosyltransferase-I activates proliferation and participates in intercellular contacts of lymphocytes, *Hum. Immunol.* 75 (2014) 1019–1025.
- [30] S. Kobayashi, T. Akiyama, K. Nata, M. Abe, M. Tajima, N.J. Shervani, M. Unno, S. Matsuno, H. Sasaki, S. Takasawa, H. Okamoto, Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10723–10726.
- [31] I. Acquatella-Tran Van Ba, S. Marchal, F. François, M. Silhol, C. Lleres, B. Michel, Y. Benyamin, J.M. Verdier, F. Trousse, A. Marcilhac, Regenerating islet-derived 1 α (Reg-1 α) protein is new neuronal secreted factor that stimulates neurite outgrowth via exostosin tumor-like 3 (EXTL3) receptor, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 4726–4739.

Annexe 3

“Tumour-necrosis factor- α induces heparan sulfate 6-*O*-endosulfatase 1 (Sulf-1) expression in fibroblasts”

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

Abstract

Heparan sulfates (HS) are involved in numerous biological processes, which rely on their ability to interact with a large panel of proteins. Thereby, structural HS remodeling is likely to play an important role in inflammatory and immune responses. However, little is known about the mechanisms resulting in HS modifications. In this study, we analyzed the effect of tumor-necrosis factor (TNF)- α on the expression of HS modifying enzymes in fibroblasts of the human cell line MRC-5 SV2. Analysis by real-time PCR showed that among these enzymes, Sulf-1 is strongly responsive to TNF- α *via* a mechanism involving activation of NF- κ B, ERK1/2 and p38 MAPK. Moreover, cell exposure to the cytokine was accompanied by secretion of an active form of Sulf-1. Compositional analysis of purified HS showed a strong reduction in the amount of the trisulfated UA2S-GlcNS6S disaccharide, thus suggesting a selective reaction of 6-*O*-desulfation in response to TNF- α . *Via* its sulfatase activity, Sulf-1 is capable of inhibiting the responses triggered by certain HS binding growth factors, including FGF-1. We therefore analyzed ERK1/2 activation and consequent cell proliferation induced by this growth factor. Our results showed that TNF- α -treated cells were weakly responsive to FGF-1 when compared to untreated cells. Conversely, silencing the expression of Sulf-1 restored the responses induced by FGF-1, indicating that the sulfatase has altered the functional features of cell surface HS in response to TNF- α treatment. Altogether, our results suggest that Sulf-1 may participate in the regulation of the responses of fibroblasts exposed to inflammatory stimuli.



Tumour-necrosis factor- α induces heparan sulfate 6-*O*-endosulfatase 1 (Sulf-1) expression in fibroblasts



Anne-Sophie Sikora¹, Charles Hellec, Mathieu Carpentier, Pierre Martinez²,
Maxime Delos, Agnès Denys, Fabrice Allain*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2016

Received in revised form 5 September 2016

Accepted 26 September 2016

Keywords:

Heparan sulfates

Sulf

Inflammation

Fibroblast

ABSTRACT

Heparan sulfate (HS) 6-*O*-endosulfatases (Sulfs) have emerged recently as critical regulators of many physiological and pathological processes. By removing 6-*O*-sulfates from specific HS sequences, they modulate the activities of a variety of growth factors and morphogens, including fibroblast growth factor (FGF)-1. However, little is known about the functions of Sulfs in inflammation. Tumour-necrosis factor (TNF)- α plays an important role in regulating the behaviour of fibroblasts. In this study, we examined the effect of this inflammatory cytokine on the expression of Sulfs in human MRC-5 fibroblasts. Compositional analysis of HS from TNF- α -treated cells showed a strong reduction in the amount of the trisulfated UA2S-GlcNS6S disaccharide, which suggested a selective reaction of 6-*O*-desulfation. Real-time PCR analysis revealed that TNF- α increased Sulf-1 expression in a dose- and time-dependent manner, *via* a mechanism involving NF- κ B, ERK1/2 and p38 MAPK. In addition, we confirmed that cell stimulation with TNF- α was accompanied by the secretion of an active form of Sulf-1. To study the function of Sulf-1, we examined the responses induced by FGF-1. We showed that ERK1/2 activation and cell proliferation were markedly reduced in TNF- α -treated MRC-5 cells compared with untreated cells. Silencing the expression of Sulf-1 by RNA interference restored the responses induced by FGF-1, which indicated that TNF- α -mediated induction of the sulfatase indeed resulted in alterations of HS biological properties. Taken together, our results indicate that Sulf-1 is responsive to TNF- α stimulation and may function as an autocrine regulator of fibroblast expansion in the course of an inflammatory response.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Heparan sulfates (HS) are linear polysaccharides that are covalently linked to core proteins to form proteoglycans. They are present at the cell membrane and in the extracellular matrix (ECM), where they modulate the binding and immobilization of many

growth factors and cytokines. Hence, they promote accumulation of their ligands in appropriate location to encounter target cells and to facilitate assembly with signalling receptors. *Via* these interactions, they participate in a variety of developmental, physiological and pathological processes (Esko and Selleck, 2002; Pomin, 2015; Sarrazin et al., 2011; Zhang, 2010). HS-protein interaction is mainly dependent on the density and position of sulfate groups into glycan backbone, which are results of the combined actions of sulfotransferases acting in the Golgi apparatus. HS precursor is composed of repeated disaccharide units formed by a glucuronic acid (GlcUA) linked to an *N*-acetyl glucosamine (GlcNAc). In the general scheme of HS biosynthesis, this chain is first subject to partial *N*-deacetylation/*N*-sulfation of GlcNAc residues. This modification is catalysed by *N*-deacetylases/*N*-sulfotransferases (NDSTs) and creates the prerequisite substrate needed for next modifications: conversion of GlcUA into iduronic acid (IdoUA) by C5-epimerase and sulfation at position C2 of uronic acid (mostly IdoUA) and at positions C6 and C3 of GlcN residues by the actions of 2-*O*-, 6-*O*- and 3-*O*-sulfotransferases (HS2ST, HS6ST and HS3ST), respectively. These modifications do not occur uniformly along HS

Abbreviations: 4-MUS, 4-methylumbelliferyl sulfate; AMAC, 2-aminoacridone; CM, conditioned medium; ECM, extracellular matrix; FCS, fetal calf serum; FGF, fibroblast growth factor; GlcUA, glucuronic acid; GlcN, glucosamine; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; HRP, horseradish peroxidase; HS, heparan sulfate; HS2ST, HS 2-*O*-sulfotransferase; HS3ST, HS 3-*O*-sulfotransferase; HS6ST, HS 6-*O*-sulfotransferase; IdoUA, iduronic acid; NDST, *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; Sulf, 6-*O*-endosulfatase; TNF- α , tumour necrosis factor- α .

* Corresponding author at: Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 du Centre National de la Recherche Scientifique—Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France.

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

¹ Present address: UCB (Union Chimique Belge), 1070 Brussels, Belgium.

² Present address: GSK—GlaxoSmithKline, 1300 Wavre, Belgium.

backbone, creating heterogeneous domains of sulfation with non- or slightly sulfated regions alternating with relatively high IdoUA content and sulfate density domains (called S-domains) bordered by short transition zones with intermediate sulfation patterns (Esko and Selleck, 2002; Kreuger and Kjellén, 2012). Importantly, most of the HS sulfotransferases are represented by various isoenzymes, which exhibit subtle differences in substrate specificity and are regulated depending on cell type and tissue environment. Therefore, tight regulation of this biosynthesis machinery could be a way to make specific HS with distinct biological functions. HS can then undergo post-synthetic modification, which is catalysed by 6-O-endosulfatases (Sulf-1 and Sulf-2). These enzymes essentially act on the trisulfated disaccharide unit UA2S-GlcNS6S, which is largely confined to S-domains of HS (Frese et al., 2009; Morimoto-Tomita et al., 2002; Pempe et al., 2012). Because 6-O-sulfation is of critical importance for binding and activity of many HS ligands, Sulfs rapidly emerged as key regulators of the functions of HS in physiological and pathological processes, such as embryogenesis, tissue regeneration and cancer (Ai et al., 2007; Alhasan et al., 2014; Ferreras et al., 2012; Vivès et al., 2014).

Fibroblasts are traditionally recognized as quiescent cells that are responsible for the production of ECM components. However, they are more and more appreciated as active key players in inflammatory responses for their capacity to secrete cytokines and growth factors and to modulate duration of leukocyte infiltrates (King et al., 2013; Rosengren et al., 2012; Smith et al., 1997). Consequently, regulatory signals preventing the expansion of fibroblasts have to be established to avoid switch from acute inflammation to chronic persistent disease (Buckley et al., 2001; Flavell et al., 2008; Kendall and Feghali-Bostwick, 2014; Van Linthout et al., 2014). In this context, we examined the effect of inflammatory stimuli on HS biosynthesis and remodelling in fibroblasts. We found that treatment of MRC-5 fibroblasts with the pro-inflammatory cytokine tumour necrosis factor (TNF)- α markedly increased the expression of Sulf-1. We then analysed the consequences of Sulf-1 overexpression on the responses induced by fibroblast growth factor (FGF)-1. Taken together, our results support a model in which Sulf-1 may function as a regulator of fibroblast expansion in the course of an inflammatory response.

2. Materials and methods

2.1. Materials and cell culture

TNF- α and FGF-1 were purchased from Peprotech (Rocky Hill, USA). I-kappa kinase (IKK) inhibitor III, JNK inhibitor II, SB 203580 and U0126 were supplied from EMD Chemicals (San Diego, USA). Genistein, DMSO, 4-methylumbelliferyl sulfate (4-MUS), benzonase and chondroitinase ABC were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Tyrphostin AG490 and wortmannin were purchased from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). Rabbit antibodies to Sulf-1 (Ab32763) and ERK1/2 were purchased from Abcam (Cambridge, USA) and Sigma, respectively. Mouse antibody to phosphorylated ERK1/2 and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies were obtained from Cell Signaling (Danvers, USA). Heparin octasaccharides (Hep-dp8) were prepared as described in Vanpouille et al. (2004). Disaccharide standards and heparinases I, II and III were purchased from Iduron (Manchester, UK), and Pronase E from Merck (Darmstadt, Germany).

MRC-5 SV2 is a human foetal lung fibroblast cell line transfected with SV40 (ECACC n°84100401, Porton Down, Salisbury, UK). It was provided by Dominique Stehelin (Institut de Biologie de Lille, France). Cells were routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 4.5 g/L glucose, Ultraglutamine-1 and 10% fetal calf serum (FCS) (Lonza,

Verviers, Belgium), at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. To circumvent a bias caused by differences in cell proliferation, subconfluent cells were rendered quiescent in DMEM containing 1% FCS overnight before use. Thereafter, all experiments were performed in the same culture medium and with cells at passages 5–7.

2.2. HS purification and disaccharide compositional analysis

HS purification and disaccharide analysis were performed essentially as described in Martinez et al. (2015). Briefly, cells (30 × 10⁶ per sample) were lysed in 2 mL of lysis buffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.8). Following treatment with Pronase E (1.5 mg/mL) and benzonase (250 mU/mL), lysates were adjusted at 2 M NaCl prior extraction with chloroform. After centrifugation, aqueous phases were dialyzed overnight in water and lyophilized. Samples were then treated with chondroitinase ABC (50 mU/sample) in lyase buffer (50 mM Tris/HCl, 60 mM sodium acetate, pH 7.8). Remaining HS were then loaded on DEAE-Sepharose column (Merck) equilibrated in Tris buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.8) containing 0.15 M NaCl. After washing, HS were eluted in the same buffer containing 2 M NaCl. Before treatment with heparinases I, II, III (10 mU of each per sample), HS content was quantified by using carbazole assay and normalized to protein content by using micro BCA protein assay (Thermo Scientific). Thereafter, dried HS digests and disaccharide standards were derivatized with 2-aminoacridone (AMAC). Reverse phase (RP)-HPLC separation of disaccharides was performed using a Kinetex core-shell C18-column (Phenomenex, Le Pecq, France) equilibrated in solution A (60 mM ammonium acetate, pH 5.6), running on a Varian Prostar 260 HPLC system. Disaccharides were eluted over a linear gradient of 10–30% solution B (100% methanol) at a flow rate of 0.7 mL/min and detected by in-line fluorescence (excitation at 428 nm and emission at 525 nm), by using a Varian ProStar 363 detector. Data were analysed with the Star software (v6.43).

2.3. RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR

Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerdtt, France) and used for reverse transcription (Maxima first strand cDNA synthesis kit, Thermo Scientific). Real-time polymerase chain reactions (qPCR) were performed as described in Martinez et al. (2015), by using Maxima SYBR Green qPCR Master Mix and Mx3005p Quantitative System (Thermo Scientific). Primer sets for HS sulfotransferases were described in Martinez et al. (2015). Synthetic primers for Sulf-1 and Sulf-2 were designed using Oligoarchitect online (Sigma): Sulf-1 (NM.01128205.1), 5'-AATCAGGAGACGGAGACATT-3' (forward) and 5'-CCAGAGCACAGCAAGAATAC-3' (reverse); Sulf-2 (NM.018837.3) 5'-CTGAGGACCAAGATGACAAG-3' (forward) and 5'-AGGATGTAGCACCGATGT-3' (reverse). For each primer pair, specificity of amplification was checked by sequencing PCR products (GATC Biotech, Konstanz, Germany). Relative quantification was determined with the Mx3005p software and the method described by Pfaffl (2001), which takes the efficiency of sequence amplification into account. Data were normalized to the mRNA level of HPRT.

2.4. Analysis of Sulf-1 production

For Western blot analysis, MRC-5 cells (1 × 10⁶ per point) were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 M NaCl. Washing supernatants were collected and proteins were precipitated with a 20% trichloroacetic acid (TCA) solution for 30 min on ice. After washing with cold acetone, dried pellets were mixed to 100 μ L of Laemmli buffer and boiled for 10 min prior

separation by SDS-PAGE (10%). Following transfer onto nitrocellulose, the membrane was blocked for 1 h at room temperature in Tris/Tween buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) supplemented with 5% non-fat dried milk. Incubation with anti-Sulf-1 antibody (1/1000) was performed overnight at 4 °C. The membrane was then washed with Tris/Tween buffer and incubated with HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1/10,000) for 1 h at room temperature. After washing, detection was achieved by using ECL kit (Amersham, Uppsala, Sweden). For Slot blot analysis, conditioned medium (CM) (corresponding to 1×10^6 cells per point) was collected and cells were washed with PBS containing 1 M NaCl. CM and NaCl washing supernatants were then passed through a nitrocellulose membrane by using a Bio-Dot SF apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA). Immunostaining with anti-Sulf-1 antibody was carried out as above. In all experiments, CM and washing supernatants were normalized to protein content of cells that conditioned the medium.

2.5. RNA interference

Synthetic small interfering RNA (siRNA) duplexes with symmetric 3' deoxythymidine overhangs were used to carry out Sulf-1 RNA interference. A set of three distinct synthetic siRNA duplexes, corresponding to Sulf-1 mRNA sequences 5'-GUUAUGGGAUGGAUGGGAA(dTdT)-3', 5'-GACAAAGAGUGCAGUUGUA(dTdT)-3', and 5'-GACUUAUCACUAACGAGA(dTdT)-3' was designed (Sigma) and tested for its efficiency to silence the expression of Sulf-1. Universal siRNA negative control #1 (Sigma) and siSulf-1 were transiently transfected in MCR-5 cells at a final concentration of 50 nM using Interferin (Polyplus, Illkirch, France), as described by the manufacturer.

2.6. In vitro Sulf activity assay

Sulfatase activity was analysed using the fluorogenic substrate 4-MUS, essentially as described in Morimoto-Tomita et al. (2002). After treatment or not with TNF- α , CM was collected and concentrated 50 times using Vivaspin-2 concentrators (30,000 MWCO, Sartorius, Aubagne, France). Protein content of cells that conditioned the medium was assayed to adjust the volumes of CM and normalize the data. Negative control was performed with cell-free DMEM in place of CM. Samples (50 μ L) were incubated with 20 mM 4-MUS in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, buffer (50 μ L) for a period varying from 3 to 6 h at 37 °C. Reaction was stopped by addition of 150 μ L of Na₂CO₃/NaHCO₃ 1 M (pH 10.7). In parallel, blanks were prepared by adding carbonate solution before the substrate. Fluorescence was measured by using a CentroLuminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany) with an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 460 nm.

2.7. Analysis of ERK1/2 activation

After treatment or not with TNF- α , MRC-5 cells were serum-starved for 2 h. They were then stimulated with 10% FCS, FGF-1 (20 ng/mL) or a combination of FGF-1 and Hep-dp8 (10 ng/mL). At various times, cells were washed in cold PBS, collected and lysed in 50 μ L of lysis buffer supplemented with 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride and protease inhibitor mixture (Roche, Penzberg, Germany) for 3 h at 4 °C. Lysates were clarified by centrifugation at 10,000g for 30 min at 4 °C and protein content was quantified by micro-BCA assay. Lysates were then used for immunoblotting as described above. ERK1/2 activation was analysed by using anti-phosphorylated ERK1/2 (p-ERK) antibody (1/2000). Immunoreactive proteins were visualized with

HRP-conjugated anti-rabbit antibody (1 h incubation, 1/10,000). Detection was achieved by using ECL detection kit.

2.8. Cell proliferation

MRC-5 cells were either treated or not with TNF- α for 48 h. After washing and serum-starvation for 2 h, they were plated at 1×10^5 cells/mL in DMEM and stimulated with 10% FCS or FGF-1 (20 ng/mL) for 24 and 48 h. At the indicated times, cells were collected and directly counted. In parallel experiments, cell proliferation was estimated by using the Cell-Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, Fitchburg, USA). To this end, 20 μ L of MTS/PMS solution was added to each well of culture (100 μ L) and the reaction was developed at 37 °C for 1 h. Absorbance was measured at 490 nm using a BioTek Epoch microplate reader (BioTek, Winooski, USA). MTS/PMS test is a colorimetric assay for assessing cell viability, thus providing information on the number of viable cells in cell proliferation experiments.

2.9. Statistical analysis

Results are representative of at least three independent experiments conducted with MRC-5 cells. Statistical significance between the different values was analysed by Student's *t*-test with a threshold of $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of TNF- α on HS remodelling and expression of HS-modifying enzymes

In order to find out whether pro-inflammatory stimulus altered the fine structure of HS in MRC-5 cells, HS disaccharides from untreated and TNF- α -treated cells were labelled with AMAC and analysed by RP-HPLC (Fig. 1A). As expected, the fluorescence profiles contained identifiable peaks, which are representative of typical HS components. Comparison of HS digests revealed a similar level of overall sulfation (0.73 versus 0.62 sulfate/disaccharide on average in untreated versus TNF- α -treated cells, respectively). A relatively higher amount of non-sulfated Δ UA-GlcNAc disaccharide was found in untreated cells, while no significant change was noticed in the level of monosulfated and disulfated disaccharides between both cell types. In contrast, a striking difference was seen in the levels of the Δ UA2S-GlcNS6S component. Indeed, HS digest from untreated cells contained a substantially higher amount of trisulfated disaccharide compared to TNF- α -treated cells (6% of total disaccharides versus less than 1%) (Fig. 1B).

We then analysed the variations of expression of HS sulfotransferases and endosulfatases. Untreated cells mainly expressed mRNA encoding nine HS-modifying enzymes: NDST1, NDST2, HS2ST, HS6ST1, HS3ST1, HS3ST3A, HS3ST3B, HS3ST5 and Sulf-1. NDST3, HS6ST2, HS6ST3, HS3ST2, HS3ST6 and Sulf-2 were barely expressed, while NDST4 and HS3ST4 were not detected. Cell treatment with TNF- α had a marked effect on the expression of three enzymes. A \sim 3-fold increase in the level of HS3ST3B mRNA was observed upon stimulation with the pro-inflammatory cytokine, while HS3ST5 expression was decreased by a factor of 4. Concomitantly, the expression of Sulf-1 was substantially increased (5–7 fold), while the level of Sulf-2 remained unchanged (Fig. 1C). Given that the levels of expression of HS6STs were not significantly modified in response to TNF- α , our results suggested that reduction in the amount of trisulfated HS disaccharide could be the consequence of 6-O-desulfation by Sulf-1. That is consistent with previous studies which indicate that Sulf-1 preferentially removes 6-O sulfates in IdoA2S-GlcNS6S-containing sequences within S-domains of HS

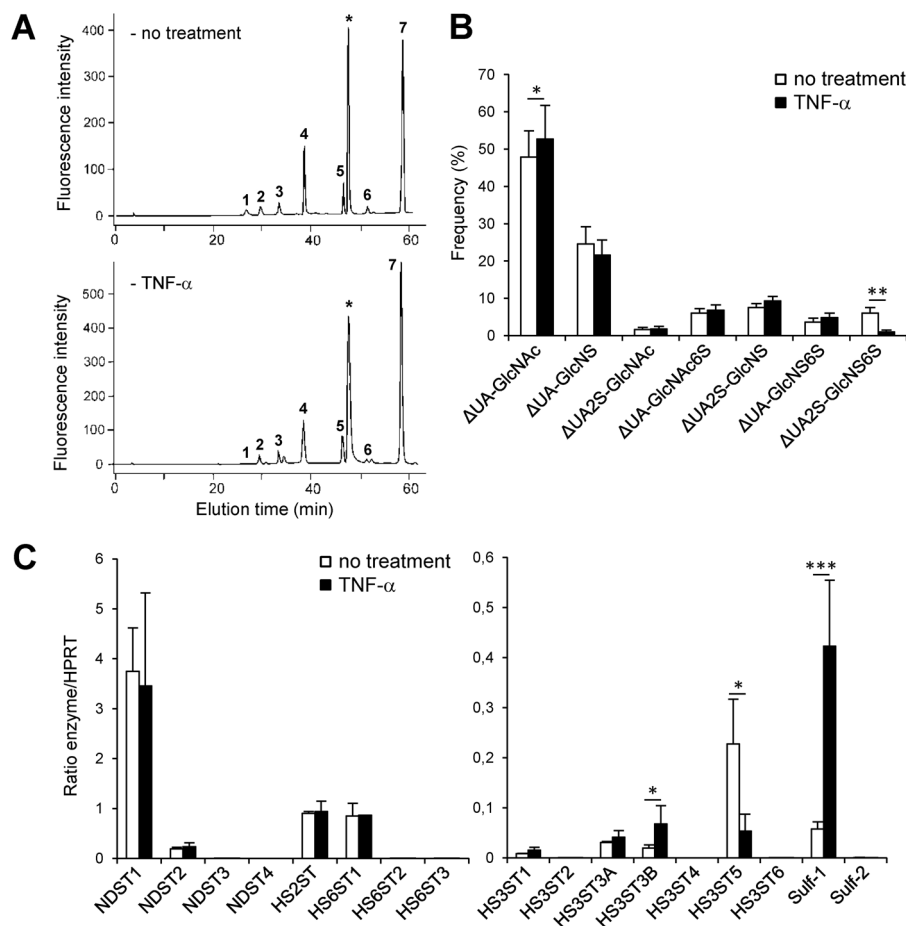


Fig. 1. Effect of TNF- α on HS biosynthesis in MRC-5 cells. (A) Disaccharide analysis of HS from MRC-5 cells. After treatment or not with TNF- α (50 ng/mL) for 48 h, HS were extracted (30×10^6 cells per sample) and digested to disaccharides with a mixture of heparinases, as described in “Materials and Methods”. Thereafter, HS disaccharides were labelled with AMAC and resolved by C18 RP-HPLC. The numbers correspond to the elution positions of standard HS disaccharides: 1, Δ UA2S-GlcNS6S; 2, Δ UA-GlcNS6S; 3, Δ UA2S-GlcNS; 4, Δ UA-GlcNS; 5, Δ UA-GlcNAc6S; 6, Δ UA2S-GlcNAc; and 7, Δ UA-GlcNAc. Peak (*) corresponds to a minor AMAC-derived contaminant (note that most of excess free AMAC is strongly retained by the RP column and elutes later than AMAC-labelled disaccharides). Representative results of two independent experiments performed in triplicates are shown. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus untreated cells) (B) Compositional disaccharide analysis of cell surface HS from untreated and TNF- α -treated MRC-5 cells. Data are expressed as the frequency of each disaccharide and correspond to mean values \pm SD from two separate experiments. (C) Expression of mRNA encoding HS sulfotransferases and Sulf-1. MRC-5 cells were either untreated or treated with 50 ng/mL of TNF- α for 24 h. Following extraction of total RNA and reverse transcription, variations in the level of mRNA encoding sulfotransferases and Sulf-1 were quantified by real-time PCR. Relative transcript abundance was normalized to endogenous HPRT transcripts. Data are mean values \pm S.D. from three experiments performed independently (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different compared to untreated cells).

(Morimoto-Tomita et al., 2002; Pempe et al., 2012; Seffouh et al., 2013; Staples et al., 2011).

3.2. Regulation of Sulf-1 expression by TNF- α

In the next experiments, we focused our investigations on Sulf-1, as it was the most responsive HS-modifying enzyme in cells exposed to TNF- α . To verify that Sulf-1 was induced in a dose-dependent manner, MRC-5 cells were stimulated with various concentrations of TNF- α . Treatment with as little as 2 ng/mL of cytokine resulted in an increased level of Sulf-1 mRNA, and 50 ng/mL TNF- α induced the maximum response (~5-fold over control) (Fig. 2A). We then performed time-course study with TNF- α at this optimal concentration (Fig. 2B). Sulf-1 mRNA level increased gradually during the first 24 h of stimulation to reach a plateau corresponding to a ~5-fold induction over basal level. Subsequent to this, mRNA levels slowly decreased during long times of treatment.

TNF- α is a strong inducer of inflammatory responses, acting via various signalling pathways. The main signalling events include activation of NF- κ B pathway and MAPK cascades, the latter leading to activation of ERK1/2, JNKs and p38 MAPK (Hanada

and Yoshimura, 2002). To determine whether these pathways are involved in Sulf-1 overexpression, MRC-5 cells were pre-treated with specific inhibitors before exposure to TNF- α . Inhibitors were: JNK inhibitor II (1 μ M), U0126 (5 μ M), SB203580 (5 μ M) and wortmannin (1 μ M) to block the activation of JNK, ERK1/2, p38 MAPK and phosphatidylinositol 3-kinases respectively, and IKK inhibitor III (10 μ M), which inhibits I κ B α phosphorylation, leading to a consequent inhibition of NF- κ B activation. As shown above, maximum induction of Sulf-1 expression was observed at 24 h post-treatment. Thus, we decided to measure the effects of the inhibitory drugs at this time of incubation (Fig. 2C). In the absence of pro-inflammatory stimulus, the levels of Sulf-1 mRNA were not significantly affected by treatment with inhibitors. In contrast, IKK inhibitor III strongly suppressed TNF- α -induced Sulf-1 expression. This finding revealed that NF- κ B activation was critically required for enhancing the transcription of the gene encoding the sulfatase. ERK1/2 and p38 MAPK inhibitors were also efficient to reduce the expression of Sulf-1 in response to TNF- α (~50% of inhibition compared to the results obtained in the absence of inhibitors). In contrast, Sulf-1 overexpression was refractory to inhibition by JNK inhibitor II and wortmannin. We showed that long-term exposure to TNF- α was required to obtain a full induction of Sulf-1, which suggested that

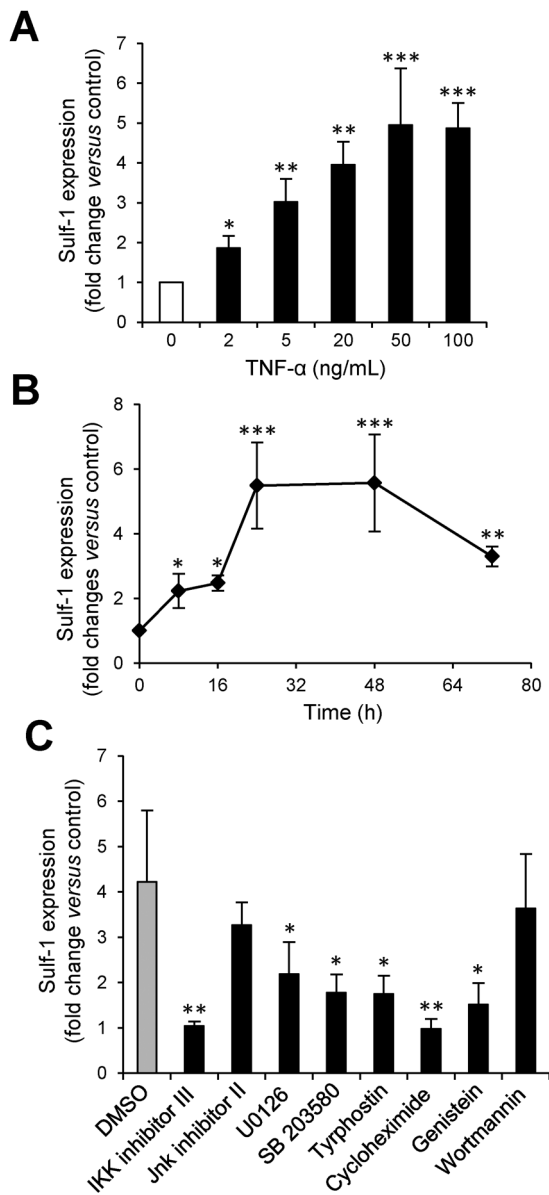


Fig. 2. Analysis of the molecular events controlling Sulf-1 overexpression in response to TNF- α . (A) Dose-dependent effect of TNF- α on Sulf-1 expression. MRC-5 cells were treated with increasing concentrations of TNF- α for 24 h and then harvested for quantitation of mRNA encoding Sulf-1 by real-time PCR. Data are mean values \pm S.D. from five separate experiments and are expressed as fold changes by comparison with untreated control cells (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus untreated cells). (B) Time-dependent effect of TNF- α on Sulf-1 expression. MRC-5 cells were either treated or not with TNF- α (50 ng/mL). At the indicated times, they were harvested for real-time PCR analysis of Sulf-1 mRNA. Variations in the levels of Sulf-1 mRNA were quantified by real-time PCR. Relative transcript abundance was normalized to endogenous HPRT mRNA. Data are mean values \pm S.D. from three experiments performed independently and are expressed as fold changes compared to untreated control cells (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus untreated cells). (C) Analysis of the signalling events controlling TNF- α -induced overexpression of Sulf-1. Cells were either untreated (DMSO) or pre-treated for 1 h with specific inhibitors prior treatment or not with TNF- α (50 ng/mL) for 24 h. Results are expressed as fold changes by comparison with untreated cells cultured in the presence of inhibitory drugs and correspond to mean values \pm S.D. from three separate experiments (* P < 0.05, ** P < 0.01, significantly different compared to TNF- α -treated cells in the absence of inhibitors).

overexpression could also depend on the synthesis of inducible proteins. To test this hypothesis, we reproduced the experiments with other inhibitors: cycloheximide (10 μ g/mL), a protein translation inhibitor; tyrphostin AG490 (50 μ M), a selective inhibitor of JAK2 and JAK3 tyrosine kinases; and genistein (100 μ M) a large spectrum tyrosine kinase inhibitor. The response triggered by TNF- α was strongly reduced by cycloheximide. This result suggested that up-regulation of Sulf-1 expression was dependent on neosynthesis of activating proteins. In addition, targeting tyrosine kinases was efficient to inhibit overexpression of Sulf-1 (Fig. 2C). Indeed, tyrphostin and genistein reduced the levels of Sulf-1 mRNA by \sim 60% compared to the levels obtained in the absence of inhibitors. Altogether, these results suggested that Sulf-1 overexpression is dependent on the activation of conventional signalling molecules, *i.e.* NF- κ B, ERK1/2 and p38 MAPK, which has to be completed by a loop of amplification involving TNF- α -inducible factors and JAK kinases.

3.3. Effect of TNF- α on the production and secretion of Sulf-1

Sulf-1 is synthesized as a \sim 125-kDa precursor that is cleaved by a furin-type proteinase. This process results in the formation of an active heterodimer, in which 75-kDa and 50-kDa subunits are linked by disulfide-bonds. The enzyme is then released in extracellular environment and/or retained at the cell membrane, probably by interaction with cell surface HS (Frese et al., 2009; Tang and Rosen, 2009). To ensure that stimulation with TNF- α was accompanied by an increase in the production of active Sulf-1, we first tested for its presence at the surface of MRC-5 cells by Western blot. To this end, cells were treated with TNF- α and then washed with a solution containing 1 M NaCl. We decided to use this procedure because it was reported to release Sulfs efficiently from intact cells (Tang and Rosen, 2009). As shown in Fig. 3A, a 50-kDa band was immunostained in NaCl washing supernatant from untreated cells. This result was expected because Ab32763 antibody recognized the 50-kDa subunit of Sulf-1. An immunostaining of higher intensity was observed after a 48-h treatment with TNF- α , which confirmed that the production of Sulf-1 was increased in response to the cytokine. Of note, we did not observe the immature 125-kDa form of Sulf-1. This finding suggested that Sulf-1 was mostly processed in our model, as the expression of Sulf-1 was biologically induced by a cytokine rather than forced with over-expression systems (Frese et al., 2009; Tang and Rosen, 2009). No other immunoreactive band could be visualized on the membrane, confirming the high specificity of this antibody. Hence, we decided to use the same antibody in Slot blot experiments to check whether Sulf-1 was released in culture supernatants. After treatment or not with TNF- α for 48 h, CM were collected and cells were rapidly washed with hypertonic solution. Thereafter, samples corresponding to CM and washing supernatants were passed through a nitrocellulose membrane in order to retain soluble proteins. As shown in Fig. 3B, Sulf-1 was barely detected in both samples from untreated cells. In contrast, a strong immunostaining was observed in CM and hypertonic washing solutions from TNF- α -treated cells. These results confirmed that the cytokine has efficiently increased the secretion of Sulf-1.

3.4. Effect of TNF- α on the activity of Sulf-1 produced from MRC-5 cells

To test the activity of secreted Sulf-1, we used an enzymatic assay based on the measurement of aryl-sulfatase activity with the fluorescent substrate 4-MUS, as already reported in Morimoto-Tomita et al. (2002). However, this substrate is not specific to Sulfs and may react with other sulfatases that were present in culture supernatant. To assure that sulfatase activity was, at least in part, attributable to secreted Sulf-1, we decided to use an approach by RNA interference. The efficacy of specific siRNA to

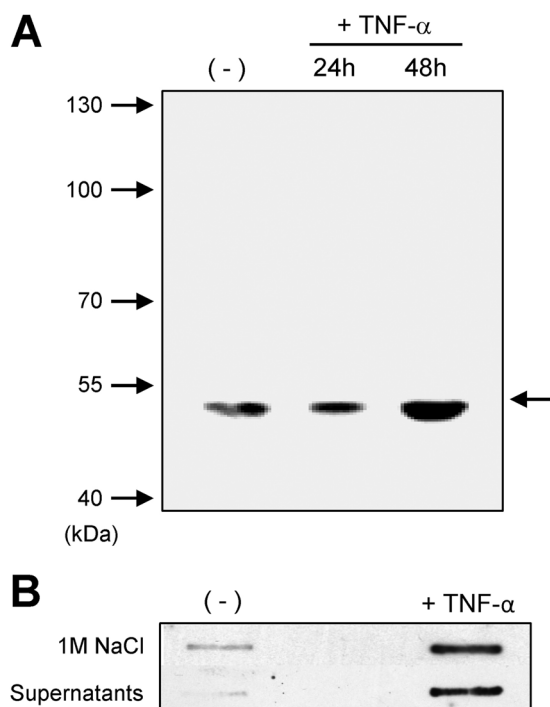


Fig. 3. Effect of TNF- α on the secretion of Sulf-1. (A) MRC-5 cells were either untreated or treated for 24 or 48 h with TNF- α (50 ng/mL). Afterwards, they were collected and rapidly washed in PBS containing 1 M NaCl. After centrifugation, washing supernatants were precipitated with 20% TCA and the resulting pellets were subjected to SDS-PAGE. Following transfer onto nitrocellulose membrane, the presence of Sulf-1 was analysed by Western blot. The apparent molecular weight of the unique reactive band was \sim 50 kDa. Representative results from three independent experiments are shown. (B) MRC-5 cells were either treated or not with TNF- α for 48 h. CM was then collected and cells that conditioned the medium were washed with PBS containing 1 M NaCl. CM and NaCl washing supernatants were then subjected to Slot blot as described in "Materials and Methods". Data were normalized to protein content of cells that conditioned the medium. Representative results from three independent experiments are shown.

reduce the expression of Sulf-1 was first checked by real-time PCR. As expected, treatment with a negative siRNA control did not modify the response of MRC-5 cells to TNF- α , with a 5-fold increase in the level Sulf-1 mRNA compared with untreated cells. In contrast, cell treatment with specific siRNA (siSulf-1) was efficient to reduce Sulf-1 expression in response to TNF- α (Fig. 4A). This inhibitory effect was further confirmed by Slot-blot analysis (Fig. 4B). In contrast to the response observed with negative siRNA control, cell treatment with specific siRNA markedly reduced the secretion of Sulf-1 in response to TNF- α . We then analysed the sulfatase activity released in CM by using 4-MUS assay. As shown in Fig. 4C, stimulation with TNF- α resulted in a 4-fold increase in sulfatase activity compared with untreated cells. Obviously, most of this activity was linked to the production of Sulf-1. Cell treatment with specific siRNA indeed reduced the sulfatase activity by \sim 50% in CM of TNF- α -treated cells.

3.5. Effect of Sulf-1 overexpression on the responses induced by FGF-1

HS play a key role in the responses triggered by many growth factors. As example, FGF-2 was described to induce sustained activation of ERK1/2, which is required for inducing cell proliferation. However, removal of cell surface HS or pharmacologic inhibition of HS sulfation resulted in transient ERK1/2 activation, which was no more sufficient to induce cell proliferation. These inhibitory effects could be reverted by addition of soluble heparin oligosaccharides, highlighting the role of S-domains within HS in the efficient

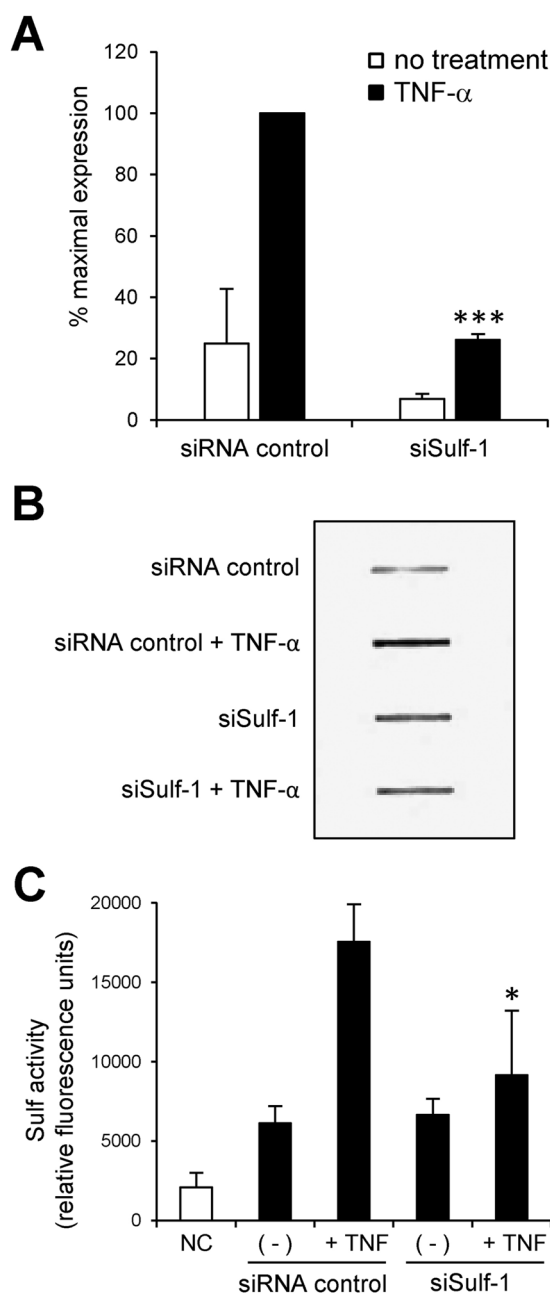


Fig. 4. Down-regulation of the expression and activity of Sulf-1 by RNA interference. Prior treatment with TNF- α (50 ng/mL), MRC-5 cells were transfected with either siRNA targeting Sulf-1 (siSulf-1) or negative control siRNA. (A) After a 24-h incubation in the absence (open bars) or presence of TNF- α (filled bars), the levels of mRNA encoding Sulf-1 were determined by real-time PCR. Results correspond to mean values \pm S.D. from three separate experiments and are presented as percentages of the maximum value obtained with TNF- α -treated cells transfected with negative control siRNA. (B) Control or siSulf-1 transfected cells were either treated or not with TNF- α for 48 h. CM was then collected and used in Slot blot experiment for Sulf-1 immunodetection. Protein content of cells that conditioned the medium was assayed to normalize the data. Representative results from three independent experiments are shown. (C) In parallel experiments, culture supernatants were subjected to a 4-MUS assay to measure sulfatase activity, as described in "Materials and Methods". NC: negative control conducted with cell-free DMEM. Data are mean values \pm S.D. from three experiments performed independently (* P < 0.05, **** P < 0.001, significantly different compared to cells transfected with the negative control siRNA).

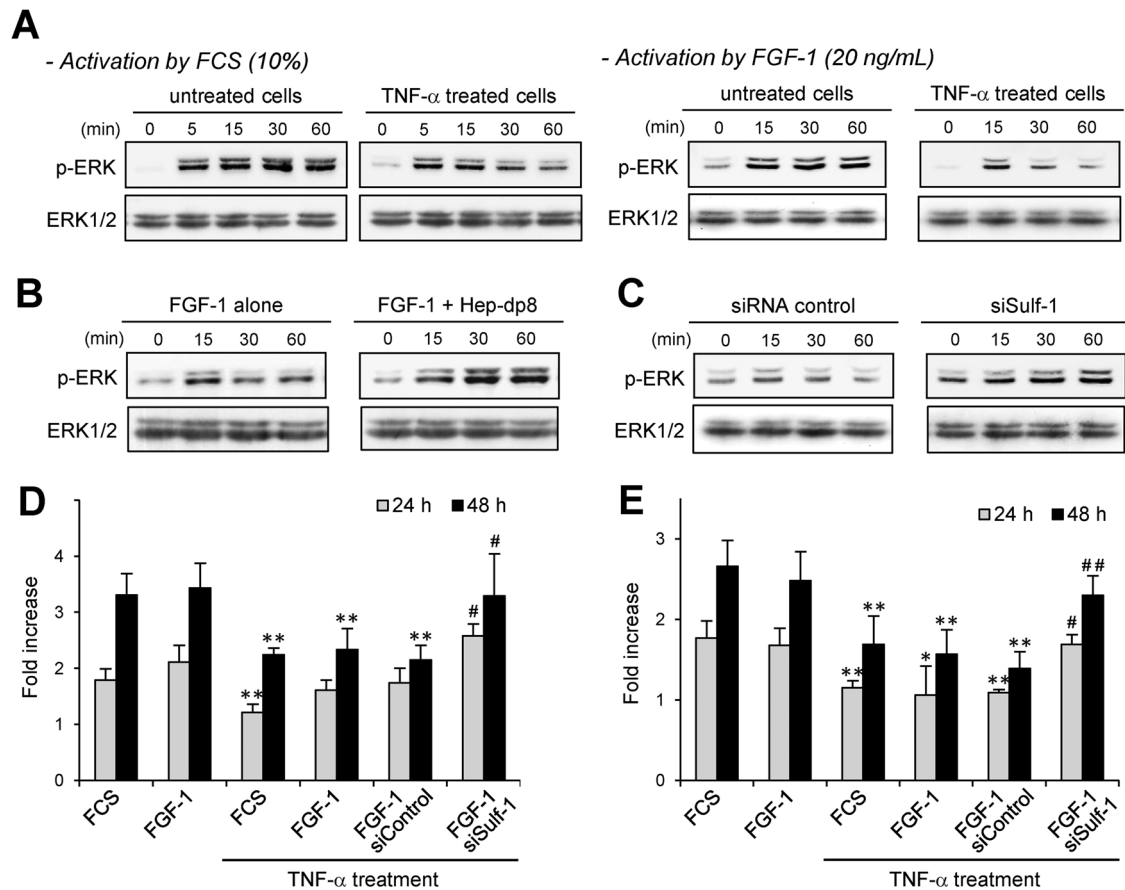


Fig. 5. Effect of Sulf-1 overexpression on ERK1/2 activation and cell proliferation induced by FGF-1. (A) MRC-5 cells were either treated or not with TNF- α (50 ng/mL) for 48 h, rapidly washed and then serum-starved for 2 h. Thereafter, they were stimulated by the addition of either FCS (10%) or FGF-1 (20 ng/mL) for various times and the phosphorylation of ERK1/2 (*p*-ERK) was analysed by Western blot. (B) After treatment with TNF- α for 48 h followed by serum starvation, cells were stimulated with FGF-1 only or in combination with heparin octasaccharides (Hep-dp8; 10 ng/mL). Phosphorylation of ERK1/2 was analysed by Western blotting as above. (C) MRC-5 cells were transfected with either siRNA control or siSulf-1 for 24 h before the addition of TNF- α for 48 h. After serum starvation, cells were stimulated for various times in the presence of FGF-1. Phosphorylation of ERK1/2 was analysed in cell lysates by Western blotting. For all experiments, parallel immunoblotting with anti-ERK1/2 confirmed equal loading of the samples. Representative results from three independent experiments are shown. (D–E) MRC-5 cells were either treated or not with TNF- α (50 ng/mL) for 48 h, rapidly washed and serum-starved for 2 h. In some parallel experiments, cells were first transfected with either siRNA control or siSulf-1 for 24 h prior treatment with TNF- α . Untreated and TNF- α -treated cells were then cultured in the presence of either FCS or FGF-1 for 24 h and 48 h, and cell proliferation was estimated by cell counting (D) and MTS/PMS assay (E). Data are mean values \pm S.D. from three experiments performed independently and are expressed as fold changes by comparison with initially added cells (1×10^5 cells per mL). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different compared to untreated cells cultured in the presence of FCS; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, significantly different compared to cells that were transfected with the negative control siRNA).

presentation of the growth factor (Delehedde et al., 2002). Among HS-binding growth factors, FGF-1 is highly dependent on the presence of HS motifs formed by the combination of IdoUA2S-GlcNS6S units (Kreuger et al., 1999; Seffouh et al., 2013). Because this sequence is preferentially targeted by Sulf-1, we decided to analyse the effect of TNF- α on the responsiveness of MRC-5 cells to FGF-1.

In the first experiments, untreated or TNF- α -treated cells were serum-starved for 2 h, and the phosphorylation status of ERK1/2 was then analysed in response to either FGF-1 or FCS, the latter being used as a source of growth factors (Fig. 5A). As expected, untreated MRC-5 cells were highly responsive to both stimuli, as demonstrated by the sustained phosphorylation of ERK1/2. In contrast, FCS and FGF-1 only induced a transient activation of ERK1/2 in TNF- α -treated cells, which peaked after 15 min and decreased gradually thereafter. To determine whether alteration in HS structure rendered TNF- α -treated cells less responsive to FGF-1, the experiments were reproduced with heparin octasaccharides (Hep-dp8). As shown in Fig. 5B, soluble oligosaccharides restored a sustained phosphorylation of ERK1/2 in response to FGF-1. This result revealed that HS from TNF- α -treated cells had lost their activating properties. Finally, we sought whether overexpression

of Sulf-1 could be responsible for the poor efficiency of FGF-1 to elicit a full activation of ERK1/2. To this end, cells were pre-treated with either negative siRNA control or specific siRNA targeting Sulf-1 before exposure to TNF- α and the activation of ERK1/2 was then analysed as above (Fig. 5C). As expected, a weak and transient activation of ERK1/2 was triggered by FGF-1 in cells that were treated with siRNA control. In contrast, silencing the expression of Sulf-1 restored the ability of the growth factor to elicit a sustained activation of ERK1/2. Finally, we analysed whether overexpression of Sulf-1 could alter the proliferative activity of FGF-1. To this end, untreated and TNF- α -treated MRC-5 cells were exposed to FCS or FGF-1 for 24 and 48 h, and cell proliferation was estimated afterwards by cell counting (Fig. 5D) and MTS/PMS assay (Fig. 5E). Compared to the responses observed with untreated cells, FCS and FGF-1 were almost twice less potent to promote cell growth after TNF- α treatment. In contrast, silencing the expression of Sulf-1 restored the proliferation of TNF- α -treated cells to a similar level to that observed in untreated cells. Taken together, these results confirmed that HS 6-O-desulfation carried out by Sulf-1 was responsible for the reduced activity of FGF-1 in TNF- α -treated MRC-5 cells.

4. Discussion

HS are involved in a wide range of cellular processes, which rely on their ability to interact with and modulate the activity of a large number of extracellular mediators. This vast repertoire of interaction is linked to the high diversity in HS structures, which is the consequence of the action of sulfotransferases and endosulfatases. However, only a few studies have taken an interest in the regulation of HS-modifying enzymes in the course of an inflammatory response. Krenn et al. (2008) reported that expression of NDST3 and HS3ST1 was reduced in endothelial cells exposed to TNF- α , while HS3ST3B was overexpressed. In recent works, we demonstrated that M1 activation of macrophages was also accompanied by a strong induction of HS3ST3B expression. In contrast, HS2ST, HS3ST1 and HS3ST2 were barely detected in M1 macrophages, while they were highly expressed in M2 macrophages (Martinez et al., 2015). These observations clearly demonstrate that the expression of HS sulfotransferases could be differently regulated by the inflammatory environment, which may lead to synthesis of HS species with distinct biological functions. Because fibroblasts are active key players in the inflammatory response (King et al., 2013; Rosengren et al., 2012; Smith et al., 1997), we decided to examine the expression of HS-modifying enzymes in response to an *in vitro* inflammatory treatment. Notably, we found that long exposure of MRC-5 fibroblasts to TNF- α induced a significant increase in the expression of HS3ST3B and Sulf-1. Increase in HS3ST3B expression was expected, since we recently demonstrated that it was up-regulated by pro-inflammatory stimuli (Sikora et al., 2016). In their recent works, Tsai et al. (2015) reported that Sulf-1 expression was increased in cellular compartments of intervertebral discs exposed to TNF- α , which is consistent with our findings. Thus, we decided to focus our investigations on Sulf-1.

To decipher the molecular mechanisms that lead to Sulf-1 overexpression, specific inhibitory drugs were used to target the main signalling molecules activated by TNF- α . Firstly, we found that activation of NF- κ B, ERK1/2 and p38 MAPK was involved in the induction of Sulf-1 expression. We then addressed the possibility that Sulf-1 expression could be regulated by inducible proteins. Translational blockage reduced Sulf-1 expression to the basal level observed in untreated cells. Moreover, inhibition of JAK kinases resulted in a strong inhibition of the response elicited by TNF- α . These results suggested that treatment with TNF- α resulted in the synthesis of regulatory proteins, which in turn led to the activation of a loop of amplification. That is consistent with the findings that type-I interferons may act as autocrine intermediates in TNF- α -induced gene expression in fibroblasts, through a mechanism dependent on the activation of JAK/STAT signalling pathways (Rosengren et al., 2012). Further identification of the responsive elements within the promoter of the gene encoding Sulf-1 will be helpful to support this model.

Although described as a secreted enzyme, Sulf-1 was reported to mainly localize at the surface of producing cells (Tang and Rosen, 2009). Here, we showed that Sulf-1 was present both at the surface and in the culture supernatants of TNF- α -treated MRC-5 cells. Moreover, we demonstrated that Sulf-1 was active towards a sulfated substrate, which revealed that it could be efficient to modify the structure of cell surface HS. Sulf-1 was reported to preferentially remove 6-O-sulfates from IdoA2S-GlcNS6S disaccharides that are found within S-domains of HS (Seffouh et al., 2013; Staples et al., 2011). We showed that HS digest from TNF- α -treated MRC-5 cells contained a substantially lower amount of trisulfated disaccharides compared with untreated cells. This finding further supported the assumption that TNF- α -induced expression of Sulf-1 may result in selective 6-O-desulfation of HS from fibroblasts. Accumulating data have demonstrated that changes in 6-O-sulfation carried out by Sulfs alter the outcome of HS-ligand interactions. As example,

Wnt exhibits a high-affinity binding activity for 6-O-sulfated HS, which is required to prevent interaction with the receptor Frizzled. Sulf-mediated 6-O-desulfation reduces the affinity between HS and Wnt, which enables binding of the morphogen to its signalling receptor (Ai et al., 2007). Sulfs also have an enhancing effect on the activity of bone morphogenetic proteins. Indeed, HS 6-O-desulfation leads to the release of the antagonist Noggin from cell surface HS, allowing these factors to interact with their cognate receptors (Viviano et al., 2004). In contrast, Sulfs may have inhibitory effects on the binding and activity of many HS ligands. Sulf-induced 6-O-desulfation was reported to destabilize the formation of chemotactic gradients for rolling leukocytes, by reducing the interactions between HS and chemokines (Pempe et al., 2012; Uchimura et al., 2006). Sulfs also impair the activity of FGFs by removing 6-O-sulfated units from HS, which prevents the formation of functional FGF/FGFR/HS ternary complexes (Wang et al., 2004). We showed here that TNF- α -treated cells were poorly responsive to FGF-1. Conversely, silencing the expression of Sulf-1 restored sustained activation of ERK1/2 and cell proliferation induced by FGF-1. These results revealed that TNF- α -induced expression of Sulf-1 has desensitized fibroblasts to the action of FGF-1, which is consistent with the demonstration that this factor is highly sensitive to HS 6-O-desulfation (Seffouh et al., 2013; Staples et al., 2011).

In addition to their function in the synthesis of ECM components, fibroblasts are now considered as key players in the inflammatory response (King et al., 2013; Rosengren et al., 2012; Smith et al., 1997). Hence, the observation that Sulf-1 was produced in fibroblasts in response to TNF- α stimulation revealed that it may function as a regulator of the inflammatory response. However, abnormal activation of fibroblasts has been implicated in chronic persistence of inflammatory signals and in interaction of tumour cells with their microenvironment. Importantly, Sulfs were found to be misregulated in a large variety of tumours, in which they alter the outcome of HS interactions with a number of bioactive factors (Vivès et al., 2014). In that context, it will be important to define whether Sulf-1 is induced in fibroblasts of patients suffering from these pathological disorders and to clarify the roles of Sulfs in adverse inflammatory processes.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflict of interest was disclosed.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS and the University of Lille. Authors would like to thank Romain Vivès for his fruitful scientific advices, Dominique Stehelin for providing us with the MRC-5 SV2 cell line, and Cevher Cevat Akten for critical reading of the manuscript.

References

- Ai, X., Kitazawa, T., Do, A.T., Kusche-Gullberg, M., Labosky, P.A., Emerson, C.P., 2007. SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation. *Development* 134, 3327–3338. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.007674>.
- Alhasan, A.A., Spielhofer, J., Kusche-Gullberg, M., Kirby, J.A., Ali, S., 2014. Role of 6-O-sulfated heparan sulfate in chronic renal fibrosis. *J. Biol. Chem.* 289, 20295–20306. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.554691>.
- Buckley, C.D., Pilling, D., Lord, J.M., Akbar, A.N., Scheel-Toellner, D., Salmon, M., 2001. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol.* 22, 199–204.
- Delehedde, M., Lyon, M., Gallagher, J.T., Rudland, P.S., Fernig, D.G., 2002. Fibroblast growth factor-2 binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates a sustained phosphorylation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and proliferation of rat mammary fibroblasts. *Biochem. J.* 366, 235–244. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20011718>.

- Esko, J.D., Selleck, S.B., 2002. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 435–471, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135458>.
- Ferreras, C., Rushton, G., Cole, C.L., Babur, M., Telfer, B.A., van Kuppevelt, T.H., Gardiner, J.M., Williams, K.J., Jayson, G.C., Avizienyte, E., 2012. Endothelial heparan sulfate 6-O-sulfation levels regulate angiogenic responses of endothelial cells to fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 287, 36132–36146, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.384875>.
- Flavell, S.J., Hou, T.Z., Lax, S., Filer, A.D., Salmon, M., Buckley, C.D., 2008. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 153, S241–S246, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707487>.
- Frese, M.A., Milz, F., Dick, M., Lamanna, W.C., Dierks, T., 2009. Characterization of the human sulfatase Sulf1 and its high affinity heparin/heparan sulfate interaction domain. *J. Biol. Chem.* 284, 28033–28044, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.035808>.
- Hanada, T., Yoshimura, A., 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 413–421.
- Kendall, R.T., Feghali-Bostwick, C.A., 2014. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* 5, 123, <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2014.00123>.
- King, S.N., Chen, F., Jetté, M.E., Thibeault, S.L., 2013. Vocal fold fibroblasts immunoregulate activated macrophage phenotype. *Cytokine* 61, 228–236, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.09.023>.
- Krenn, E.C., Wille, I., Gesslbauer, B., Poteser, M., van Kuppevelt, T.H., Kungl, A.J., 2008. Glycanogenomics: a qPCR-approach to investigate biological glycan function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 297–302, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.144>.
- Kreuger, J., Kjellén, L., 2012. Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability. *J. Histochem. Cytochem.* 60, 898–907, <http://dx.doi.org/10.1369/0022155412464972>.
- Kreuger, J., Prydz, K., Pettersson, R.F., Lindahl, U., Salmivirta, M., 1999. Characterization of fibroblast growth factor 1 binding heparan sulfate domain. *Glycobiology* 9, 723–729.
- Martinez, P., Denys, A., Delos, M., Sikora, A.S., Carpentier, M., Julien, S., Pestel, J., Allain, F., 2015. Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* 25, 502–513, <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwu137>.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S., Rosen, S.D., 2002. Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *J. Biol. Chem.* 277, 49175–49185, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M205131200>.
- Pempe, E.H., Burch, T.C., Law, C.J., Liu, J., 2012. Substrate specificity of 6-O-endosulfatase (Sulf-2) and its implications in synthesizing anticoagulant heparan sulfate. *Glycobiology* 22, 1353–1362, <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cws092>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pomin, V.H., 2015. Sulfated glycans in inflammation. *Eur. J. Med. Chem.* 92, 353–369, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.01.002>.
- Rosengren, S., Corr, M., Firestein, G.S., Boyle, D.L., 2012. The JAK inhibitor CP-690,550 (tofacitinib) inhibits TNF-induced chemokine expression in fibroblast-like synoviocytes: autocrine role of type I interferon. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 440–447, <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2011.150284>.
- Sarrazin, S., Lamanna, W.C., Esko, J.D., 2011. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a004952>.
- Seffouh, A., Milz, F., Przybylski, C., Laguri, C., Oosterhof, A., Bourcier, S., Sadir, R., Dutkowski, E., Daniel, R., van Kuppevelt, T.H., Dierks, T., Lortat-Jacob, H., Vivès, R.R., 2013. HSulf sulfatases catalyze processive and oriented 6-O-desulfation of heparan sulfate that differentially regulates fibroblast growth factor activity. *FASEB J.* 27, 2431–2439, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.12-226373>.
- Sikora, A.S., 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, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.25444>.
- Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M., Phipps, R.P., 1997. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am. J. Pathol.* 151, 317–322.
- Staples, G.O., Shi, X., Zaia, J., 2011. Glycomics analysis of mammalian heparan sulfates modified by the human extracellular sulfatase HSulf2. *PLoS One* 6, e16689, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016689>.
- Tang, R., Rosen, S.D., 2009. Functional consequences of the subdomain organization of the Sulf s. *J. Biol. Chem.* 284, 21505–21514, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.028472>.
- Tsai, T.T., Ho, N.Y., Fang, H.C., Lai, P.L., Niu, C.C., Chen, L.H., Chen, W.J., Pang, J.H., 2015. Increased sulfatase 1 gene expression in degenerative intervertebral disc cells. *J. Orthop. Res.* 33, 312–317, <http://dx.doi.org/10.1002/jor.22766>.
- Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z., Rosen, S.D., 2006. HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem.* 7, 2, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2091-7-2>.
- Van Linthout, S.V., Miteva, K., Tschöpe, C., 2014. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc. Res.* 102, 258–269, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvu062>.
- 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, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20031453>.
- Vivès, R.R., Seffouh, A., Lortat-Jacob, H., 2014. Post-synthetic regulation of HS structure: the Yin and Yang of the Sulf s in cancer. *Front. Oncol.* 3, 331, <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2013.00331>.
- Viviano, B.L., Paine-Saunders, S., Gasunas, N., Gallagher, J., Saunders, S., 2004. Domain-specific modification of heparan sulfate by Qsulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin. *J. Biol. Chem.* 279, 5604–5611, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M310691200>.
- Wang, S., Ai, X., Freeman, S.D., Pownall, M.E., Lu, Q., Kessler, D.S., Emerson, C.P., 2004. Qsulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4833–4838, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401028101>.
- Zhang, L., 2010. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 93, 1–17, [http://dx.doi.org/10.1016/S1877-1173\(10\)93001-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1877-1173(10)93001-9).