

9
N° d'ordre : 1539

THESE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du titre

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Option : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Fabrice ALLAIN

**LA CYCLOPHILINE B
ET SON RÉCEPTEUR MEMBRANAIRE :
IMPLICATIONS DANS LA SENSIBILITÉ LYMPHOCYTAIRE A
LA CYCLOSPORINE A**

Soutenu le 26 juin 1995 devant la commission d'examen :

Président : Professeur André VERBERT
Rapporteurs : Docteur Bernard HAENDLER
Professeur Bernhard RYFFEL
Examineurs : Professeur Geneviève SPIK
Professeur Jean-Paul DESSAINT
Docteur Andrzej GALAT

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Geneviève SPIK dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111 : Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires ; Directeur : Professeur André VERBERT).

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

A Joe et à Manon,
avec tout mon amour

A ma famille ,
avec toute mon affection

A Monsieur le Professeur André VERBERT

Malgré vos nombreuses occupations, vous avez accepté de me faire l'honneur de présider cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Geneviève SPIK

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe et de m'avoir fait confiance pour ce travail que j'ai réalisé avec le plus grand plaisir. J'ai toujours trouvé auprès de vous beaucoup de gentillesse et de disponibilité, et je vous en suis profondément reconnaissant.

A Monsieur le Professeur Bernhard RYFFEL

J'ai toujours eu beaucoup de plaisir à discuter avec vous, et j'ai pu apprécier vos nombreux conseils, votre disponibilité et votre gentillesse. Vous avez bien voulu me faire l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteur. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur Bernard HAENDLER

Vous avez toujours suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt, et vous avez accepté de me faire l'honneur d'assister à ma thèse en tant que rapporteur. Veuillez croire en l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean-Paul DESSAINT

Vous avez suivi mes travaux avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance, en me prodiguant toujours de précieux conseils. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Andrzej GALAT

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.

A Monsieur le Professeur Emérite Jean MONTREUIL

Votre dynamisme et votre passion pour la Recherche ont toujours été un exemple pour moi, et je tiens à vous exprimer ma plus vive reconnaissance et mon profond respect.

Je tiens à remercier tous ceux qui, par leur collaboration, leur aide et leur sympathie, m'ont aidé dans la réalisation de ce travail :

Monsieur le Professeur André TARTAR, pour ses précieux conseils en chimie des protéines.

Christophe BOUTILLON, pour la préparation des peptides synthétiques

Pascal MICHAUX et *Jean-Pascal DUMON*, pour la préparation de la cyclophiline B recombinante.

Eric MASY pour ses précieuses connaissances et son étroite collaboration dans le domaine des transplantations d'organes.

Le groupe du Professeur B. Ryffel de l'Institut de Toxicologie de Zürich, et en particulier *Gaetane WOERLY* et *Michel LE HIR*, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur accueil chaleureux lors de mon séjour dans leur laboratoire.

Madame CELEN pour la préparation des diapositives.

Jean-Pierre DECOTTIGNIES, pour son assistance technique lors de la préparation des anticorps.

Annick PIERCE et *Monique BENAÏSSA* pour leur disponibilité et leurs précieux conseils en biologie moléculaire.

Agnès DENYS et *Christophe MARILLER* pour notre étroite collaboration au sein du groupe des "cyclophilinistes" et les bons moments passés ensemble.

et tous ceux qui, par leur amitié et leurs encouragements m'ont soutenu tout au long de ces années et m'ont aidé à terminer ce travail.

Abréviations

Abu : acide aminobutyrique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ARN : acide ribonucléique

Bip : binding immunoglobulin protein

BSA : bovine serum albumin

CaM : calmoduline

CAML : calcium signal modulating
cyclophilin ligand

CD : cluster of differentiation

CD28RC : CD28 responsive complex

CMH : complexe majeur
d'histocompatibilité

CnA : calcineurine A

CnB : calcineurine B

CPAg : cellule présentatrice de l'antigène

cpm : coup par minute

CsA, CsF, CsG, CsH, CsM :
cyclosporine A, F, G, H, M

Ct : C-terminal

CyCAP : cyclophilin C-associated protein

CyP, CyPA, CyPB, CyPC, CyPD :
cyclophiline A, B, C, D

DAB : diaminobenzidine

DI₅₀ : dose inhibitrice à 50%

DPBS : Dulbecco's phosphate buffered
saline

E.coli : Escherichia coli

ELISA : Enzyme Linked Immuno
Sorbent Assay

FGF : fibroblast growth factor

FPLC : fast protein liquid
chromatography

GM-CSF : granulocyte-macrophage
colony stimulating factor

GST : glutathion-S-transférase

HDL : high density lipoprotein

HIV : human immunodeficiency virus

HLA : human leukocyte antigen

HPLC : high performance liquid
chromatography

HSP : heat shock protein

IgG, M : immunoglobuline G, M

IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-8 :
interleukine-1, -2, -3, -4, -8

IP3 : inositol triphosphate

IPTG : isopropyl thio-galactoside

Kd : constante de dissociation

kDa : kilodalton

KLH : keyhole limpet hemocyanin

LB : bouillon Luria-Bertani

LDL : low density lipoprotein

MDR : multi-drug resistance

MeBmt : butényl-N-diméthyl-thréonine

MM : masse molaire

NF-AT : nuclear factor of activated T
cell

NF-IL2 : nuclear factor of interleukine-2

NF-kB : nuclear factor of kB

NK : natural killer cells

NK-TR : natural killer tumor recognition molecule

Nt : N-terminal

Nuc18 : nucléase de 18 kDa

OPD : ortho-phényl diamine

PBMC : peripheral blood mononuclear cells

PBS : phosphate buffer saline

PDI : protein disulfide isomerase

pHi : pH isoélectrique

PIP2 : phosphatidyl inositol diphosphate

PKA, PKC : protéine kinase A, C

PLC : phospholipase C

PL-CS : photolabile cyclosporine

PMN : polymorphonuclear cells

PP1, PP2A, PP2B, PP2C : protéine phosphatase 1, 2A, 2B, 2C

PPIase : peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase

R.E. : réticulum endoplasmique

Rh1, Rh2 : rhodopsine 1, 2

R-IL2 : récepteur de l'interleukine-2

RMN : résonance magnétique nucléaire

Sar : sarcosine

SDS : sodium dodecyl sulfate

TCR : T-cell receptor

TGF : transforming growth factor

TNF : tumor necrosing factor

VLDL : very low density lipoprotein

ZAP : zeta-associated protein

Acides aminés :

A (Ala) : alanine

C (Cys) : cystéine

D (Asp) : acide aspartique

E (Glu) : acide glutamique

F (Phe) : phénylalanine

G (Gly) : glycine

H (His) : histidine

I (Ile) : isoleucine

K (Lys) : lysine

L (Leu) : leucine

M (Met) : méthionine

N (Asn) : asparagine

P (Pro) : proline

Q (Gln) : glutamine

R (Arg) : arginine

S (Ser) : sérine

T (Thr) : thréonine

V (Val) : valine

W (Trp) : tryptophane

Y (Tyr) : tyrosine

Sommaire

Sommaire

| | |
|--|----|
| | 1 |
| <i>Introduction</i> | |
| | 5 |
| <i>Généralités</i> | |
| | 8 |
| LES IMMUNOPHILINES | |
| I. De la découverte de la cyclosporine A aux mécanismes moléculaires de l'immunosuppression | 8 |
| II. Les immunophilines, récepteurs des immunosuppresseurs | 9 |
| | |
| LA FAMILLE DES CYCLOPHILINES | |
| I. Structure et localisation des cyclophilines | 12 |
| A. Les cyclophilines cytosoliques | 12 |
| 1. <i>La cyclophiline A</i> | 12 |
| 2. <i>La cyclophiline 40</i> | 14 |
| B. Les cyclophilines sécrétées | 15 |
| 1. <i>La cyclophiline B</i> | 15 |
| 2. <i>La cyclophiline C</i> | 18 |
| 3. <i>La cyclophiline D</i> | 18 |
| 4. <i>Les autres cyclophilines sécrétées</i> | 19 |
| C. Les cyclophilines membranaires | 20 |
| 1. <i>Le produit du gène Nina A</i> | 20 |
| 2. <i>Le récepteur NK-TR des cellules Natural Killer</i> | 20 |
| 3. <i>Les formes mineures de cyclophilines membranaires</i> | 21 |
| II. Propriétés des cyclophilines | 26 |
| A. Fixation de la cyclosporine | 26 |
| 1. <i>La cyclosporine</i> | 26 |
| 2. <i>Les complexes cyclophiline/cyclosporine A (CyP/CsA)</i> | 27 |
| B. Activité peptidyl prolyl cis-trans isomérase | 29 |
| 1. <i>Activité enzymatique des cyclophilines</i> | 29 |
| 2. <i>Mesures de l'activité rotamase</i> | 30 |
| 3. <i>Les différentes PPIases</i> | 31 |
| a. <i>Les FKBP(s)</i> | 32 |

| | |
|--|----|
| <i>b. les parvulines</i> | 33 |
| C. Rôles biologiques des cyclophilines | 33 |
| 1. <i>Mise en conformation des protéines</i> | 33 |
| 2. <i>les récepteurs des cyclophilines</i> | 35 |
| <i>a. Les protéines de stress</i> | 35 |
| <i>b. Le récepteur CAML</i> | 35 |
| <i>c. Le récepteur CyCAP</i> | 36 |
| <i>d. Le canal ADP/Ca²⁺ mitochondrial</i> | 37 |
| <i>e. Les rhodopsines</i> | 37 |
| <i>f. La protéine gag du HIV</i> | 38 |
| <i>g. Les récepteurs des FKBP(s)</i> | 38 |
| 3. <i>Activités particulières des cyclophilines</i> | 39 |
| <i>a. Activité chimiotactile</i> | 39 |
| <i>b. Activité mitogène</i> | 39 |
| <i>c. Activité nucléasique</i> | 39 |
| D. Les cyclophilines et la calcineurine | 40 |
| 1. <i>La calcineurine</i> | 40 |
| 2. <i>Fixation spécifique des complexes immunosuppresseurs</i> | 40 |
| 3. <i>Interactions calcineurine-CsA-cyclophiline</i> | 42 |

LA CYCLOSPORINE A ET L'IMMUNITÉ DE GREFFE

| | |
|---|----|
| I. Le rejet de greffe | 45 |
| A. Les antigènes de l'alloreconnaissance | 45 |
| B. Les mécanismes du rejet | 46 |
| 1. <i>La phase de sensibilisation</i> | 46 |
| <i>a. Nature des cellules sensibilisantes</i> | 46 |
| <i>b. Activation du lymphocyte T</i> | 46 |
| <i>c. Migration du lymphocyte sensibilisé</i> | 51 |
| 2. <i>La phase effectrice</i> | 51 |
| <i>a. Les lymphocytes cytotoxiques</i> | 51 |
| <i>b. Les cellules de l'hypersensibilité retardée</i> | 52 |
| <i>c. Les anticorps</i> | 52 |
| II. Prévention du rejet de greffe | 54 |
| A. Le traitement immunosuppresseur | 54 |
| 1. <i>Les immunosuppresseurs</i> | 54 |

| | |
|---|----|
| 2. <i>Activités de la cyclosporine</i> | 54 |
| B. Mécanismes moléculaires de l'action de la CsA | 56 |
| 1. <i>Une cible commune pour les complexes immunosuppresseurs</i> | 56 |
| 2. <i>La calcineurine au centre de l'immunosuppression</i> | 58 |
| 3. <i>Les substrats de la calcineurine</i> | 59 |
| III. Hétérogénéité de la réponse à la CsA | 61 |
| A. Problèmes liés à l'utilisation clinique de la CsA | 61 |
| 1. <i>Variations de sensibilité lymphocytaire</i> | 61 |
| 2. <i>Toxicité de la CsA</i> | 62 |
| B. Facteurs influençant l'activité de la CsA | 63 |
| 1. <i>Distribution et pharmacocinétique de la CsA</i> | 63 |
| 2. <i>Modulations des mécanismes d'action de la CsA</i> | 64 |
| a. <i>Variations des voies de transduction des signaux d'activation</i> | 64 |
| α. <u>les voies sensibles à la CsA</u> | 64 |
| β. <u>les voies résistantes à la CsA</u> | 65 |
| b. <i>Importance des récepteurs de la CsA</i> | 65 |
| α. <u>les récepteurs intracellulaires</u> | 66 |
| β. <u>les récepteurs membranaires</u> | 68 |
| γ. <u>les récepteurs extracellulaires</u> | 69 |
| IV. Conclusion | 72 |

Travaux personnels

| | |
|--|----|
| | 74 |
| DISTRIBUTION RELATIVE DE LA CYPA ET DE LA CYPB DANS LES COMPARTIMENTS DU SANG | |
| I. Introduction | 74 |
| II. Résultats | 75 |
| <i>Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies.</i> | |
| III. Conclusion | 94 |
| | |
| CARACTÉRISATION D'UN RÉCEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA CYPB À LA SURFACE DES LYMPHOCYTES T HUMAINS | |
| I. Introduction | 95 |

| | |
|--|-----|
| II. Résultats | 95 |
| <i>Characterization of Surface Binding Sites for Cyclophilin B on a Human Tumor T-cell Line.</i> | |
| III. Conclusion | 111 |

RÔLE DE LA CYPB DANS L'INCORPORATION DE LA CSA DANS LES LYMPHOCYTES T HUMAINS

| | |
|---|-----|
| I. Introduction | 112 |
| II. Résultats | 112 |
| <i>Cyclophilin B mediates Cyclosporin A Incorporation in Human Blood T-Lymphocyte through its Specific Binding to cell Surface.</i> | |
| III. Conclusion | 136 |

Conclusion générale

| | |
|-------|-----|
| | 137 |
|-------|-----|

Bibliographie

| | |
|-------|-----|
| | 143 |
|-------|-----|

Appendice technique

| | |
|-------|-----|
| | 165 |
|-------|-----|

| | |
|--|-----|
| I. Production de la CyPB recombinante | 165 |
| A. Préparation du plasmide codant pour la CyPB | 165 |
| B. Culture de la bactérie transformée | 166 |
| C. Extraction et purification de la CyPB recombinante | 166 |
| II. Méthodes d'analyse des protéines | 167 |
| A. Préparation des échantillons | 167 |
| B. Electrophorèse et électrotransfert des protéines | 168 |
| C. Immunorévélation des protéines | 168 |

Introduction

Les cyclophilines forment une famille de protéines ubiquitaires très conservées, capables d'accélérer *in vitro* l'isomérisation des liaisons prolyls. Elles possèdent la propriété de fixer spécifiquement la cyclosporine A (CsA), molécule couramment utilisée pour ses propriétés immunosuppressives dans la prévention des rejets de greffe. Chez l'Homme, la cyclophiline la plus abondante est une protéine cytosolique de 18 kDa, la cyclophiline A (CyPA). La formation du complexe CyPA-CsA serait à l'origine de la suppression de la réponse précoce du système immunitaire, en inhibant la calcineurine, une phosphatase indispensable à l'activation des lymphocytes T auxiliaires.

Au Laboratoire, une protéine capable de s'associer spécifiquement à la CsA a été caractérisée pour la première fois dans le lait humain. Elle fut identifiée comme étant la cyclophiline B (CyPB), protéine résidente de la lumière du réticulum endoplasmique. Cependant, sa découverte dans le lait suggérait qu'elle puisse être présente dans d'autres liquides biologiques, en particulier, dans le sang où elle pourrait intervenir dans les mécanismes d'immunosuppression. Il semblait donc intéressant de caractériser et doser la CyPB dans le sang, afin d'étudier les relations éventuelles entre le taux de CyPB et la sensibilité à la CsA, et de déterminer ensuite les interactions entre cette protéine et les lymphocytes T, cibles spécifiques de l'immunosuppression.

Les CyPA et CyPB possèdent 60% d'homologie de séquence, et plus de 80% dans la partie centrale conservée. L'utilisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines recombinantes montrant des réactions croisées, il nous était nécessaire de préparer des anticorps spécifiques contre des peptides synthétiques correspondant aux séquences divergentes des deux protéines. Ces anticorps nous ont permis de développer une méthode de dosage ELISA sélective pour la CyPA et la CyPB.

Ces dosages ont été utilisés pour mesurer les taux de CyPA et de CyPB dans le plasma et les cellules du sang, de nombreuses lignées cellulaires et leurs surnageants de culture. Nous avons ainsi montré que la CyPB est présente dans les leucocytes et les plaquettes du sang, à une concentration moyenne de 250 ng/mg de protéines, ce qui est dix fois inférieure à celle de la CyPA. De plus, seule la CyPB a été retrouvée dans le plasma, ce taux étant sujet à de larges variations individuelles, mais restant en étroite relation avec le taux de CyPB des leucocytes d'un même individu.

La découverte de la CyPB dans le plasma laissait supposer que cette protéine pouvait interagir avec certaines cellules du sang. Nous avons donc recherché une fixation de cette protéine sur ces différentes cellules isolées du sang et sur des lignées cellulaires. Nous avons ainsi montré que la CyPB se fixe à la surface des lymphocytes T du sang et de

nombreuses lignées T leucémiques. Par contre, aucune fixation n'est observée sur les autres cellules du sang. En outre, nous avons montré que le complexe CyPB/CsA se fixait de façon semblable sur les lymphocytes, ce qui suggère que le site d'interaction avec l'immunosuppresseur n'est pas impliqué dans la fixation. Les études cinétiques de fixation montrent une endocytose partielle de la CyPB, dépendante de la température. Cette internalisation est maximale entre 20 et 30 minutes d'incubation à 37°C, et la protéine est ensuite relarguée dans le milieu sous une forme dégradée.

Nous avons ensuite étudié l'incorporation du complexe CyPB/CsA dans les lymphocytes T circulants. Contrairement à la CyPB, la CsA incorporée via le complexe n'est pas retrouvée dans le milieu et s'accumule dans la cellule. Lorsque les taux de CyPB/CsA sont élevés, nous avons observé une forte diminution de l'incorporation de l'immunosuppresseur, ce qui pourrait s'expliquer par une moindre disponibilité de la CsA. Par contre, pour des valeurs faibles, inférieures ou proches de la capacité de fixation du récepteur de la CyPB, l'incorporation de CsA est nettement supérieure à celle observée en absence de CyPB, supposant l'intervention d'un mécanisme spécifique d'internalisation du complexe dans les lymphocytes T.

Enfin, nous avons vérifié que la CsA incorporée par l'intermédiaire du complexe CyPB/CsA conservait ses propriétés immunosuppressives, suggérant que le médicament et la protéine suivent deux voies différentes dans la cellule.

Ces différents résultats suggèrent un rôle prédominant de la CyPB et de son récepteur lymphocytaire dans la sélectivité d'action de la CsA et les variations individuelles de sensibilité au médicament.

Ces travaux ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS

F. Allain, A. Denys and G. Spik. (1994) Characterization of surface binding sites for cyclophilin B on a human tumor T-cell line. *J. Biol. Chem.* **269**, 16537-16540.

F. Allain, C. Boutillon, C. Mariller and G. Spik. (1995) Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies. *J. Immunol. Meth.* **178**, 113-120.

F. Allain and G. Spik. Cyclophilin 20, in *Human Protein Data*, Ed. A. Haerberli. V.C.H. 3rd Installment, 1995.

F. Allain, A. Denys and G. Spik. Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through its specific binding to cell surface. *En révision dans J. Biol. Chem.*

C. Mariller, F. Allain, M. Kouach and G. Spik. Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Soumis à publication dans Biochim. Biophys. Acta*

COMMUNICATIONS

F. Allain et G. Spik. Mise au point d'un dosage immunoenzymatique de l'exocyclophiline dans le sang de sujets sains et de sujets greffés. XIX^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et Biologie moléculaire, 7-10 Juillet 1992, Caen.

F. Allain, A. Denys et G. Spik. Mise en évidence de sites de fixation spécifiques de la cyclophiline B à la surface d'une lignée lymphocytaire T humaine. Colloque de Printemps de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Regard sur les Protéines, 7-10 Juin 1994, Marseille, et XXI^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et Biologie Moléculaire, 5-8 Juillet 1994, Reims.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un contrat européen Biomed de la CEE (n° BMH1-CT93-1748) : **Optimizing of cyclosporin immunosuppression : role of the different cyclosporin receptor and CD28 activation pathway for activity and toxicity.**

Généralités

LES IMMUNOPHILINES

I. De la découverte de la cyclosporine A aux mécanismes moléculaires de l'immunosuppression

Découverte au début des années 1970, la cyclosporine A (CsA) a rapidement suscité un vif intérêt en raison de ses propriétés anti-prolifératives dans les expériences *in vitro* d'activation lymphocytaire (Borel *et al.*, 1976). Ses premières utilisations cliniques ont contribué à un nouvel essor dans le domaine des transplantations d'organes et de moelle osseuse, en augmentant considérablement le temps de survie des allogreffes. Ce médicament est encore couramment utilisé aujourd'hui comme principal agent immunosuppresseur dans les thérapies de prévention de rejet de greffe et le traitement de certaines maladies auto-immunes, et cela malgré ses effets toxiques.

Les premiers travaux sur les mécanismes d'action de la CsA ont permis de découvrir que ce médicament inhibait la production d'interleukine-2 (IL-2) (Bunjes *et al.*, 1981), la transcription de nombreux gènes de lymphokines (Krönke *et al.*, 1984), en bloquant les voies de transduction Ca^{2+} -dépendantes (Baldari, 1991), et qu'il exerçait ses propriétés immunosuppressives en se fixant à des cibles intracellulaires spécifiques, les cyclophilines (Handschumacher *et al.*, 1984 ; Walsh *et al.*, 1992).

L'intérêt scientifique pour les mécanismes moléculaires de l'immunosuppression a été renforcé par la découverte plus récente de deux autres composés immunosuppresseurs, le FK506 et la rapamycine. Ces médicaments, de la famille des macrolides, n'ont aucune homologie structurale avec la CsA (Fig. 1, p. 10), et pourtant, le premier reproduit son effet en bloquant sélectivement l'activation Ca^{2+} -dépendante du lymphocyte T, alors que le second agit plus tardivement en inhibant la prolifération induite par l'IL-2. La découverte d'un récepteur commun spécifique du FK506 et de la rapamycine, mais différent des cyclophilines, et nommé FKBP (FK-506 binding protein), a ouvert de nouvelles voies de recherches sur les mécanismes moléculaires impliquant les récepteurs des immunosuppresseurs (Siekerka *et al.*, 1989a ; Harding *et al.*, 1989).

Les différents travaux ont ainsi rapidement permis de caractériser deux familles de protéines de structure très conservée, les cyclophilines et les FKBP(s). De plus, à côté de leurs utilisations cliniques, les immunosuppresseurs ont été et représentent encore de

formidables outils pour analyser les voies de transduction des signaux et comprendre les mécanismes intimes d'activation et de prolifération cellulaire (Emmel *et al.*, 1989 ; Mattila *et al.*, 1990 ; Sigal & Dumont, 1992 ; Fruman *et al.*, 1994).

II. Les immunophilines, récepteurs des immunosuppresseurs

En 1991, Schreiber proposa de réunir les cyclophilines et les FKBP(s) dans la famille des immunophilines, en raison de leur capacité à fixer un immunosuppresseur.

Les immunophilines se définissent comme des protéines capables de fixer spécifiquement et réversiblement un ou plusieurs immunosuppresseurs, permettant à ces composés d'exprimer leurs propriétés immunosuppressives dans la cellule. D'après les connaissances actuelles, cette famille peut se diviser en trois groupes, en relation avec la structure et la spécificité de fixation de ses représentants.

- les cyclophilines : protéines de 17 à 160 kDa capables de fixer la CsA et certains de ses dérivés.

- les FKBP(s) ou macrophilines : protéines de 12 à 63 kDa, fixant les macrolides FK506 et rapamycine.

- une troisième famille, minoritaire, composée de protéines hétérogènes sans homologies structurales avec les protéines précédentes, capables de fixer soit la CsA, soit le FK506, voire les deux (Soldin, 1992). De plus, la découverte de nouveaux immunosuppresseurs laisse supposer l'existence de nouvelles immunophilines (Schreiber, 1991).

En dehors de leur rôle de médiateurs dans l'immunosuppression, cyclophilines et FKBP(s) ont de nombreuses autres propriétés communes :

- elles ont une activité peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase, ou rotamase, activité enzymatique inhibée par la fixation de leur ligand respectif (Fischer *et al.*, 1989 ; Takahashi *et al.*, 1989 ; Siekerka *et al.*, 1989b).

- elles ont une répartition phylogénétique très large. Elles sont exprimées chez les procaryotes, levures, champignons, invertébrés, plantes et bien sur vertébrés. Leurs structures sont très conservées au cours de l'évolution, suggérant qu'elles proviennent de gènes ancestraux communs aux deux familles de protéines. De plus, cette conservation suggère des fonctions physiologiques très importantes (Trandinh *et al.*, 1992). On a recensé

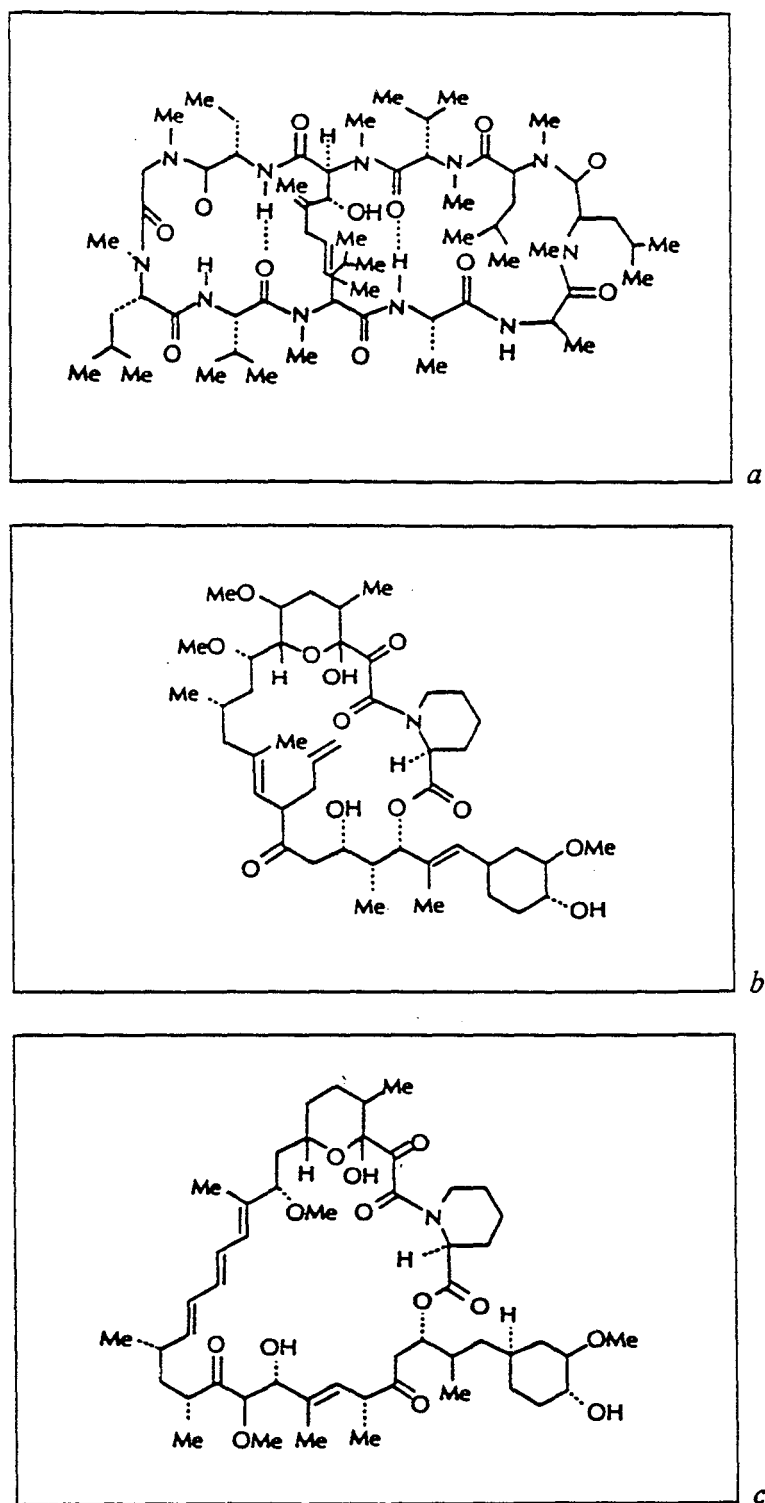


FIGURE 1 : Structures de la cyclosporine A (a), du FK506 (b) et de la rapamycine (c).

actuellement au moins 35 séquences pour les cyclophilines et 18 pour les FKBP(s), mais ce nombre ne fait qu'augmenter (Galat, 1993 ; Fischer, 1994).

- elles sont présentes dans la majorité des tissus d'un même organisme, représentées par de nombreuses isoformes de localisation subcellulaire différente.

- la fixation des immunosuppresseurs sur les immunophilines est nécessaire mais pas suffisante pour inhiber l'activation des lymphocytes T. Il semble donc que l'inhibition de l'activité rotamase de ces enzymes n'est pas directement responsable de l'immunosuppression, suggérant l'intervention d'un troisième partenaire. Ainsi, malgré leurs différences structurales, les complexes CsA/CyP et FK506/FKBP se fixent spécifiquement à une protéine-phosphatase impliquée dans la transduction des signaux d'activation Ca^{2+} -dépendants, la calcineurine. La formation de ce complexe ternaire a pour effet d'inhiber l'activité phosphatasique Ca^{2+} -dépendante et de bloquer l'activation du lymphocyte T (Liu *et al.*, 1991 ; Fruman *et al.*, 1992a).

Au cours des chapitres suivants, nous nous intéresserons plus particulièrement aux cyclophilines, et à leur ligand immunosuppresseur, la CsA. Quand cela sera nécessaire, quelques analogies seront faites avec les FKBP(s), notamment en ce qui concerne les propriétés biologiques des deux familles d'immunophilines, et le mode d'action des immunosuppresseurs.

LA FAMILLE DES CYCLOPHILINES

I. Structure et localisation des cyclophilines

Globalement, les cyclophilines peuvent être classées en trois catégories, selon que leur ARNm code pour une protéine possédant ou non une séquence signal de sécrétion. L'absence de ce peptide va favoriser leur localisation cytosolique, tandis que sa présence dirigera les protéines soit dans la lumière des structures membranaires intracellulaires ou le milieu extracellulaire, soit permettra leur ancrage à la membrane plasmique.

A. Les cyclophilines cytosoliques

1. La cyclophiline A

La première protéine fixant la CsA, nommée cyclophiline puis cyclophiline A (CyPA), a été purifiée à partir de thymocytes de boeuf par échange de cations en mode HPLC. Le séquençage partiel de cette protéine de masse moléculaire apparente 15 kDa n'a pas permis de l'identifier à une protéine connue à l'époque (Handschumacher *et al.*, 1984). Sa séquence complète a ensuite été déterminée et a permis de caractériser son homologue humain dans la rate (Harding *et al.*, 1986).

L'ADNc de la CyPA humaine a été caractérisé à partir d'une banque d'ADNc de cellules de la lignée lymphoblastique T Jurkat. Il a permis de déduire la séquence complète de la protéine et de caractériser l'existence d'une famille de gènes homologues dans le génome humain (Haendler *et al.*, 1987). Ainsi, il existe au moins 20 gènes apparentés, mais celui de la CyPA n'est représentée que par une seule copie, formée de cinq exons et de quatre introns (Haendler & Hofer, 1990).

La CyPA a été identifiée comme étant une peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase (PPIase). En effet, les séquences des CyPA humaine et bovine sont identiques à celle de la PPIase isolée de rein de porc, et les protéines ont la même masse moléculaire et la même activité enzymatique inhibée par la fixation de CsA (Fischer *et al.*, 1989 ; Takahashi *et al.*, 1989).

Toutes les CyPA ont une masse moléculaire de 17,7 +/- 0,5 kDa. Cependant, la majorité des CyPA d'origine eucaryote ont un pHi basique, tandis que leurs équivalents d'origine procaryote ont un pHi acide (Galat, 1993).

Les études en RMN des diffraction en rayons X montrent que la CyPA humaine a une structure globale en feuillets β (Fig. 2, p. 16). Sa structure secondaire est formée de 17% d'hélices α , 34% de feuillets β et 17% de coudes β . La molécule est formée de 8 feuillets β , disposés en deux unités perpendiculaires de 4 feuillets β , reliées entre elles par des coudes β et des hélices α (25-41 ; 119-123 ; 135-146). Sa séquence est riche en résidus phénylalanine (6-8%), ce qui explique son fort indice d'hydrophobicité. La plupart des parties hydrophobes de la chaîne sont repliées dans une crevasse où est localisé le site de fixation de la CsA, les autres zones hydrophobes étant situées dans les régions connectives entre feuillets β et hélices α (Kallen *et al.*, 1991 ; Ke *et al.*, 1991 ; Wüthrich *et al.*, 1991 ; Spitzfaden *et al.*, 1992).

L'utilisation d'anticorps anti-CyPA en immunofluorescence permet de confirmer que la CyPA a une localisation cytosolique, mais montre une association ponctuelle avec des structures vésiculaires (Sarris *et al.*, 1992). De même, des analyses en microscopie électronique suggèrent sa présence dans le cytosol, mais également dans le compartiment nucléaire (Ryffel *et al.*, 1991). Des travaux plus récents indiquent que les cyclophilines associées aux membranes intracellulaires sont toutes de masse moléculaire supérieure à 18 kDa et correspondent à d'autres isoformes. De plus la CyPA apparaît associée aux membranes nucléaires, mais ne serait pas représentée dans le noyau. (Azhdarian *et al.*, 1993). Cependant, la CyPA présente de fortes homologues de séquence et des propriétés semblables avec une nucléase de 18 kDa, dépendante du calcium et impliquée dans l'apoptose, la NUC18 (Montague *et al.*, 1994).

La CyPA est présente dans toutes les cellules et représente de 0,1 à 0,4% des protéines totales. Elle est particulièrement abondante dans le cerveau, le rein, les parotides et les cellules du sang (Ryffel *et al.*, 1991 ; Marks *et al.*, 1991). Globalement, le taux de CyPA est dépendant de l'état de la cellule. Dans les fibroblastes MRC5, son expression augmente dans les cellules qui prolifèrent et diminue dans les cellules transformées par le virus simien SV40 (Celis *et al.*, 1991). Les cellules en mitose présentent une intensité de marquage en immunofluorescence beaucoup plus importante que les cellules quiescentes. De la même façon, le taux de CyPA diminue en fonction de l'état de différenciation des lignées érythroïdes et myéloblastiques. Ces techniques de microscopie ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter la protéine dans les plaquettes et les hématies (Sarris *et*

et al., 1992). Une concentration importante de CyPA est observée dans le cortex cérébral et l'hippocampe, le taux étant plus élevé dans les neurones que dans les cellules gliales (Lad *et al.*, 1992). Un taux élevé est également observé dans les tissus néoplasiques (Koletsy *et al.*, 1986) et dans certaines cellules traitées à la CsA, en particulier dans les hépatocytes (Sarris *et al.*, 1992 ; McDonald *et al.*, 1992). Les esters de phorbol, la phytohémagglutinine et la CsA affectent peu le taux d'ARNm de la CyPA dans les lymphocytes humains (Haendler *et al.*, 1987). Par contre, ce taux augmente après stimulation des lymphocytes par la concanavaline A, et est restauré en présence d'acide okadaïque, inhibiteur spécifique des protéine-phosphatases PP1 et PP2A. Il semble donc que ces deux enzymes interviennent dans la régulation de l'expression de la CyPA (Richards *et al.*, 1992).

La CyPA a également été détectée dans le plasma par dosage ELISA, bien que son ARNm ne code pas pour un peptide signal qui dirigerait la protéine vers l'espace extracellulaire (Ryffel *et al.*, 1991). Des auto-anticorps de classe IgG et IgM dirigés contre la CyPA sont présents dans le plasma d'individus atteints de lupus érythémateux et de la maladie de Lyme, mais pas chez les individus sains ou atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de sclérose systémique. Ces anticorps sont plus spécifiques pour la forme dénaturée de la CyPA, mais son origine, sécrétion ou lyse cellulaire, n'est pas connue (Kratz *et al.*, 1992 ; Harigai *et al.*, 1992).

La CyPA est largement exprimée dans les différents tissus des végétaux supérieurs, tels que maïs, blé, tomate et *Brassicae napus*, et possède 83% d'homologies de séquence avec la CyPA humaine (Gasser *et al.*, 1992). Son taux d'ARNm est augmenté en cas de stress, comme en cas de choc thermique, de blessure, de choc salin, ou d'exposition à des températures froides (Marivet *et al.*, 1992). La levure *Saccharomyces cerevisiae* a un équivalent de la CyPA, nommée *CYP1*, et possédant 60% d'homologie de séquence avec la CyPA humaine (Haendler *et al.*, 1989). Il faut souligner que *S. cerevisiae* est un excellent modèle pour étudier *in vivo* les rôles des différentes cyclophilines.

2. La cyclophiline 40

La cyclophiline-40 (CyP40) a été isolée par affinité sur une colonne de CsA immobilisée. Son domaine N-terminal présente de fortes homologies de séquence avec la CyPA. Il s'agit d'une protéine cytosolique de 40 kDa, représentée par deux isoformes de pHi 5,3 et 5,5 dans les hépatocytes de rat (Kieffer *et al.*, 1992 ; Kieffer *et al.*, 1993). La CyP40 est un composant du récepteur inactif des hormones stéroïdes, et son domaine Ct a des homologies avec une autre sous-unité de ce récepteur, la p59, protéine de la famille des

FKBP(s) (Peattie *et al.*, 1992). Les récepteurs de la progestérone et des glucocorticoïdes sont présents dans le cytosol sous forme de complexes inactifs. Après fixation de leurs ligands respectifs, ils migrent dans le noyau sous une forme active pour interagir avec des domaines activateurs de l'ADN. Ces récepteurs sont des complexes oligomériques contenant des HSP(s), les HSP70 et HSP90, la p59, la CyP40 et une p23 spécifique. Les structures homologues entre le domaine Ct de la CyP40 et la partie centrale de la p59 sont sans doute impliquées dans les interactions des deux protéines avec les autres sous-unités du récepteur des stéroïdes (Ratajczak *et al.*, 1993).

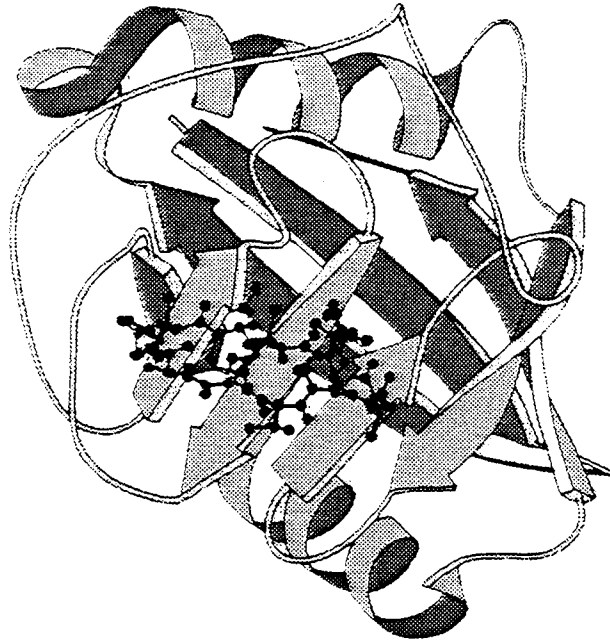
B. Les cyclophilines sécrétées

1. La cyclophiline B

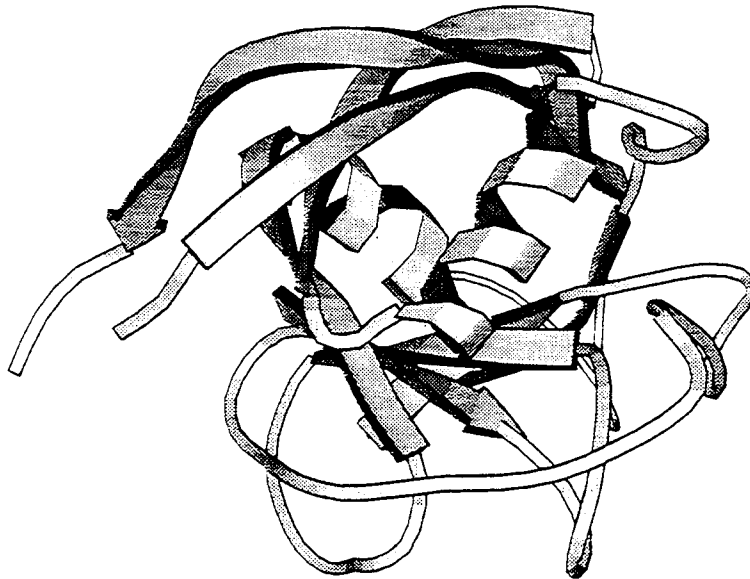
La cyclophiline B (CyPB) est une protéine de 21 kDa, dont l'ARNm code pour un peptide signal qui n'est pas retrouvé dans la protéine mature. Ce peptide permet la translocation de la protéine dans les vésicules du réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion (Price *et al.*, 1991 ; Bergsma *et al.*, 1991). Le criblage d'une banque d'ADNc de rat avait permis de caractériser une cyclophiline différente de la CyPA, possédant 86% d'homologies de séquence avec la CyPB humaine (Iwai & Inagami, 1990).

L'utilisation d'une sonde nucléotidique correspondant au domaine N-terminal spécifique de la protéine a permis de localiser le gène de la CyPB humaine sur le chromosome 15 et de montrer qu'il était représenté par une seule copie (Peddada *et al.*, 1992). Dans la plupart des tissus, le taux d'ARNm codant pour la CyPB est 5 à 10 fois inférieur à celui de la CyPA (Bergsma *et al.*, 1991).

La CyPB humaine possède 65% d'homologies avec la CyPA. La comparaison des séquences des CyPA et CyPB permet de distinguer plusieurs domaines dans ces protéines. Le domaine I correspond à la séquence peptide signal, absente de la CyPA et de la CyPB mature. Les deux domaines suivants sont les plus conservés et possèdent respectivement 57 et 79% d'homologies. Ils contiennent les acides aminés impliqués dans le site catalytique et dans le site de fixation de la CsA. Les domaines IV et V, correspondant aux peptides C-terminaux, sont les moins homologues (Price *et al.*, 1991). La conformation de la CyPB a été déterminée par diffraction aux rayons X. La structure globale de la CyPB est très semblable à celle de la CyPA (Fig. 2, p. 16), mais des différences significatives apparaissent



(a)



(b)

FIGURE 2 : Représentations tridimensionnelles de deux cyclophilines humaines :

(a). CyPA complexée à la CsA (Schreiber & Crabtree, 1992).

(b). CyPB (Mikol et al., 1994).

dans les boucles C- et N-terminales. La poche hydrophobe est identique à celle de la CyPA (Mikol *et al.*, 1994).

Les études sur la localisation de la CyPB sont souvent contradictoires. Des expériences de fractionnement subcellulaire indiquent sa présence dans les vésicules lourdes du réticulum endoplasmique (Hasel *et al.*, 1991). Cependant, la protéine mature, nommée SCYLP pour "Secreted Cyclophilin-Like Protein", a été retrouvée sous une forme sécrétée dans le lait de femme (Spik *et al.*, 1991). Une protéine identique, nommée "s-cyclophilin", a été clonée à partir d'une banque d'ADNc d'embryon de poulet et est abondamment sécrétée dans le milieu après transfection (Caroni *et al.*, 1991). Des études en immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques montrent que la CyPB est localisée dans des vésicules intracellulaires, mais que sa distribution est différente de celle des marqueurs classiques du réticulum endoplasmique. Elle est retenue par son extrémité C-terminale VEKPFAlAKE dans des vésicules stockant le Ca^{2+} , les calciosomes. L'addition de ce peptide à des protéines normalement excrétées les retient dans les mêmes vésicules. La CyPB est colocalisée avec la calréticuline dans la plupart des cellules, et avec la calséquestrine dans les cellules du muscle strié. Dans les plaquettes activées, elle est localisée dans une structure en forme d'anneau à proximité de la membrane, correspondant à la répartition des saccules à Ca^{2+} (Arber *et al.*, 1992). Cependant, des expériences plus récentes suggèrent que la CyPB est présente tout au long de la voie de sécrétion, au niveau de la membrane plasmique et faiblement sécrétée dans le milieu environnant de fibroblastes en culture. De plus, la CsA provoque son relargage massif dans le milieu, ce qui suggère que l'immunosuppresseur entre en compétition avec les ligands naturels de la CyPB, sans doute des protéines néosynthétisées en voie de sécrétion (Price *et al.*, 1994). La purification d'une PPIase à partir de microsomes de foie de boeuf a permis de caractériser une protéine de 20,6 kDa, sensible à la CsA, et identifiée après séquençage de l'extrémité N-terminale comme étant la CyPB (Bose *et al.*, 1994). La CyPB a également été purifiée à partir du cerveau de boeuf où elle est représentée à 5 μ g/g de matière sèche, suggérant qu'elle est particulièrement abondante dans cet organe (Galat & Bouet, 1994).

Chez les végétaux supérieurs, un équivalent de CyPB est présent dans les chloroplastes et sa synthèse est régulée par la lumière. D'ailleurs, alors que la CyPA est présente dans tous les tissus de la plante, la CyPB n'est présente que dans les feuilles (Luan *et al.*, 1994). *S. cerevisiae* possède également un équivalent de la CyPB à localisation membranaire, la CYP2 (Koser *et al.*, 1991).

2. *La cyclophiline C*

La CyPC a été clonée à partir d'une banque d'ADNc de souris. C'est une protéine de 23 kDa, dont l'ARNm code pour un peptide signal susceptible de diriger la protéine vers des structures membranaires intracellulaires (Friedman & Weissman, 1991). Elle est d'ailleurs retrouvée dans les vésicules du réticulum endoplasmique après transfection (Bram *et al.*, 1993).

La structure de la CyPC a été réalisée par diffraction aux rayons X. Elle diffère essentiellement de la CyPA au niveau de trois boucles, dont l'une d'elles, située à proximité du site catalytique, revêt une importance pour les propriétés spécifiques de cette cyclophiline, en particulier sa fixation à un récepteur spécifique (Ke *et al.*, 1993a).

La CyPC de souris a une distribution tissulaire restreinte. Elle est abondamment exprimée dans le rein, faiblement dans les cellules T et le foie, et semble absente des autres tissus testés (Friedman & Weissman, 1991). Dans le rein de souris, les études comparées des quantités d'ARNm de la CyPA et de la CyPC montrent que la CyPA est répartie de façon ubiquitaire dans tout le néphron, alors que la CyPC est surtout localisée dans le tubule proximal. De plus, l'augmentation du taux d'ARNm de la CyPC en présence de CsA suggère que cette cyclophiline peut intervenir dans les phénomènes de néphrotoxicité (Otsuka *et al.*, 1994).

La séquence de la CyPC humaine a été criblée à partir d'une banque d'ADNc de cellules de rein. Elle est moins représentée que la CyPA, mais contrairement à la CyPC de souris, elle est exprimée dans tous les tissus testés. La quantité d'ARNm est environ 10 fois inférieure à celle de la CyPA dans le rein et différents organes tels que le foie, le poumon, le pancréas, le muscle et le coeur, ce qui est contradictoire avec la répartition de la CyPC murine et le rôle possible de cette protéine dans la néphrotoxicité. Par contre, elle est peu représentée dans le cerveau et les cellules Jurkat (Schneider *et al.*, 1994).

3. *La cyclophiline D*

Le criblage de banques d'ADNc issues de cellules de la lignée T Jurkat et d'hépatocytes humains a permis de caractériser, en dehors de la CyPA (hCyp1) et de la CyPB (hCyp2), une troisième cyclophiline nommée hCyp3, puis CyPD. Comme la CyPB, la CypD possède un peptide signal qui dirige la protéine vers des structures membranaires intracellulaires. La CyPD possède 76% d'homologies de séquence avec la CyPA, et 62 % avec la CyPB.

Le taux d'ARNm de la CyPD est de 50 à 100 fois inférieur à celui de la CyPA. Il n'est pas modifié lors de l'activation lymphocytaire, et la protéine est représentée dans les cellules de tous les tissus testés à des taux très faibles. Un anticorps anti-CyPD reconnaît plusieurs protéines après immunorévélation. La protéine majoritaire a une masse moléculaire apparente de 18 kDa, ce qui suggère que la protéine mature a perdu un peptide de 4 kDa (43 acides aminés) par rapport à la masse initiale de la protéine déduite de la séquence de l'ADNc (Bergsma *et al.*, 1991).

Une cyclophiline de 18,6 kDa a été purifiée à partir de la matrice mitochondriale d'hépatocytes de foie de rat. Cette protéine a été partiellement séquencée et montre de fortes homologues avec les cyclophilines sécrétées (Connern et Halestrap, 1992). Une protéine similaire de 19 kDa a été purifiée à partir de la matrice mitochondriale de cellules de coeur de boeuf. Le séquençage de son extrémité N-terminale a montré une forte homologie avec la séquence de la hCYP3 recombinante (Inoue *et al.*, 1993).

Chez *Neurospora crassa*, un seul gène code pour deux cyclophilines, une cytosolique et une mitochondriale, obtenues par épissage alternatif (Tropshug *et al.*, 1988). Chez la levure, la CYP3 serait l'équivalent de la CyPD (McLaughlin *et al.*, 1992).

4. Les autres cyclophilines sécrétées

D'autres cyclophilines sécrétées ont été caractérisées par homologues de séquence avec des cyclophilines connues.

Une protéine de 18 kDa, la sp18, est retrouvée dans le surnageant des macrophages de souris activées *in vitro* par le lipopolysaccharide bactérien et possède des activités inflammatoires *in vivo* et chimiotactiles *in vitro*. Le séquençage partiel de cette protéine suggère qu'il pourrait s'agir de la CyPA, bien que celle-ci ne possède pas de peptide signal de sécrétion. Cependant, d'autres protéines telles que le FGF (Fibroblast Growth Factor) et l'IL-1 β sont connues pour être sécrétées en l'absence de peptide signal (Sherry *et al.*, 1992). De même, la recherche de facteurs chimiotactiles dans l'urétrus de rats traités aux oestrogènes a permis d'isoler une protéine de 18 kDa dont les 15 acides aminés N-terminaux sont identiques à ceux de la CyPA (Xu *et al.*, 1992).

Après activation par le FGF, les fibroblastes de souris sécrètent de nombreuses protéines dont certaines restent à être identifiées. Ainsi, le séquençage partiel de la SIP24, glycoprotéine de 24 kDa, a permis d'identifier cette protéine comme étant une isoforme sécrétée de la famille des cyclophilines (Davis *et al.*, 1991).

Chez *S. cerevisiae*, une cyclophiline possédant la séquence HDEL en position C-terminale a été clonée et localisée par microscopie de fluorescence dans les vésicules du réticulum endoplasmique (Frigerio & Pelham, 1993). Le tétrapeptide HDEL, ou KDEL chez les eucaryotes supérieurs, correspond à un signal consensus de rétention dans la lumière du réticulum endoplasmique et est également retrouvé à l'extrémité C-terminale d'autres protéines telles que la PDI (Protein Disulfide Isomerase) et la Bip (Binding Immunoglobulin Protein) (Munro & Pelham, 1987).

C. Les cyclophilines membranaires

1. Le produit du gène *Nina A*

Le gène *NinaA* de *Drosophila melanogaster* code pour une cyclophiline transmembranaire de 26 kDa (Schneuwly *et al.*, 1989). La protéine est glycosylée et le domaine cyclophiline est orienté dans la lumière du réticulum endoplasmique. Elle possède un seul domaine transmembranaire et une partie cytosolique réduite de sept acides aminés. Elle est indispensable pour la stabilité et le transport des rhodopsines Rh1 et Rh2 dans le photorécepteur R1-R6 de la drosophile. Elle possède 42 % d'homologie de séquence avec la CyPA humaine (Shieh *et al.*, 1989). Une protéine équivalente a été caractérisée dans la rétine et le cortex cérébral de boeuf, par immunorévélation avec des anticorps spécifiques de *NinaA* (Stamnes *et al.*, 1991).

2. Le récepteur NK-TR des cellules Natural Killer

Le récepteur de reconnaissance des tumeurs exprimé par les cellules Natural Killer (NK) contient une protéine de 150 kDa présentant des homologies de séquence avec les cyclophilines. Cette protéine a été dénommée NK-TR pour "Natural Killer cell tumor recognition molecule". Elle a une masse moléculaire apparente de 158 kDa (p158) chez l'Homme et de 160 kDa (p160) chez la Souris, les deux formes possédant 80% d'homologies de séquence. Le NK-TR est formé d'un domaine cyclophiline en position N-terminale, de trois domaines fortement chargés, similaires à certains domaines des histones, et de trois domaines riches en sérine, arginine et lysine (Anderson *et al.*, 1993).

La transcription du gène du NK-TR peut donner trois produits différents, par épissage alternatif. La protéine la plus courte correspond aux domaines cytosolique, intramembranaire et cyclophiline. La forme dominante correspond à la protéine avec une

délétion de 25 acides aminés à proximité du domaine cyclophiline. Quant à la forme entière, elle n'est exprimée qu'après activation des cellules NK par l'IL-2 (Rinfret & Anderson, 1993).

Une sous-population de lymphocytes T est caractérisée par une activité cytotoxique indépendante de l'activation du TCR, appelée activité NK-like. L'utilisation de sondes anti-sens du gène *nk-tr* abolit l'activité cytotoxique de ces lymphocytes, ce qui suggère que le mécanisme de cytotoxicité indépendante du TCR est associée à la présence de la molécule NK-TR, et que l'activité NK-like des lymphocytes est un mécanisme similaire à l'activité propre des cellules NK (Chambers *et al.*, 1994).

3. Les formes mineures de cyclophilines membranaires

Une cyclophiline de 22 kDa a été caractérisée à la surface des cellules de foie de rat. Elle présente de fortes homologies de séquence avec la CyPB, est très basique (pHi : 9,3-9,6), et possède un glycanne lié O-glycosidiquement de structure galactosyl N-galactosamine (Thalhammer *et al.*, 1992). La mise en évidence indirecte d'un récepteur spécifique des lymphocytes pour la CsA suggère la présence d'une cyclophiline membranaire sur ces cellules, mais la protéine n'a pu être caractérisée (Cacalano *et al.* 1992).

Le récepteur σ est un complexe de trois protéines de 28, 40 et 65 kDa, intervenant dans les mécanismes neuromodulateurs. Il est exprimé à la surface des cellules des tissus nerveux, ainsi que sur les hépatocytes et les leukocytes. Le séquençage partiel de la p28 purifiée à partir d'hépatocytes de rat montre que cette protéine a de fortes homologies avec les cyclophilines (Schuster *et al.*, 1994).

Chez la levure, le gène SCC3 code pour une cyclophiline membranaire ayant de fortes homologies de séquence avec NinaA (Franco *et al.*, 1991).

Les caractéristiques des cyclophilines d'origine humaine, la comparaison de leur structure et les homologies de séquences des quatre isoformes majeures sont reportées dans le tableau 1, p. 22 et les figures 3 et 4, p. 23 et p. 24.

TABLEAU 1 : les cyclophilines d'origine humaine.

| Protéine | N _{AA} | MM _{kDa} | Code | Référence |
|----------|-----------------|-------------------|--------|--------------------------------|
| CyPA | 165 | 18 | X52851 | Haendler <i>et al.</i> , 1987 |
| pCyPB | 208 | 22,7 | CSHUB | Price <i>et al.</i> , 1991 |
| CyPB | 184 | 20,3 | M63573 | Spik <i>et al.</i> , 1991 |
| pCyPC | 213 | 22,9 | - | Schneider <i>et al.</i> , 1994 |
| pCyPD | 207 | 22 | M80254 | Bergsma <i>et al.</i> , 1991 |
| CyPD | 164 | 18 | " | Bergsma <i>et al.</i> , 1991 |
| CyP40 | 370 | 40,8 | L11667 | Kieffer <i>et al.</i> , 1993 |
| NK-TR | 1403 | 157,7 | L04288 | Anderson <i>et al.</i> , 1993 |

N_{AA} : nombre d'acides aminés à partir de la séquence déduite de l'ADNc

MM_{kDa} : masse moléculaire calculée

p : peptide signal

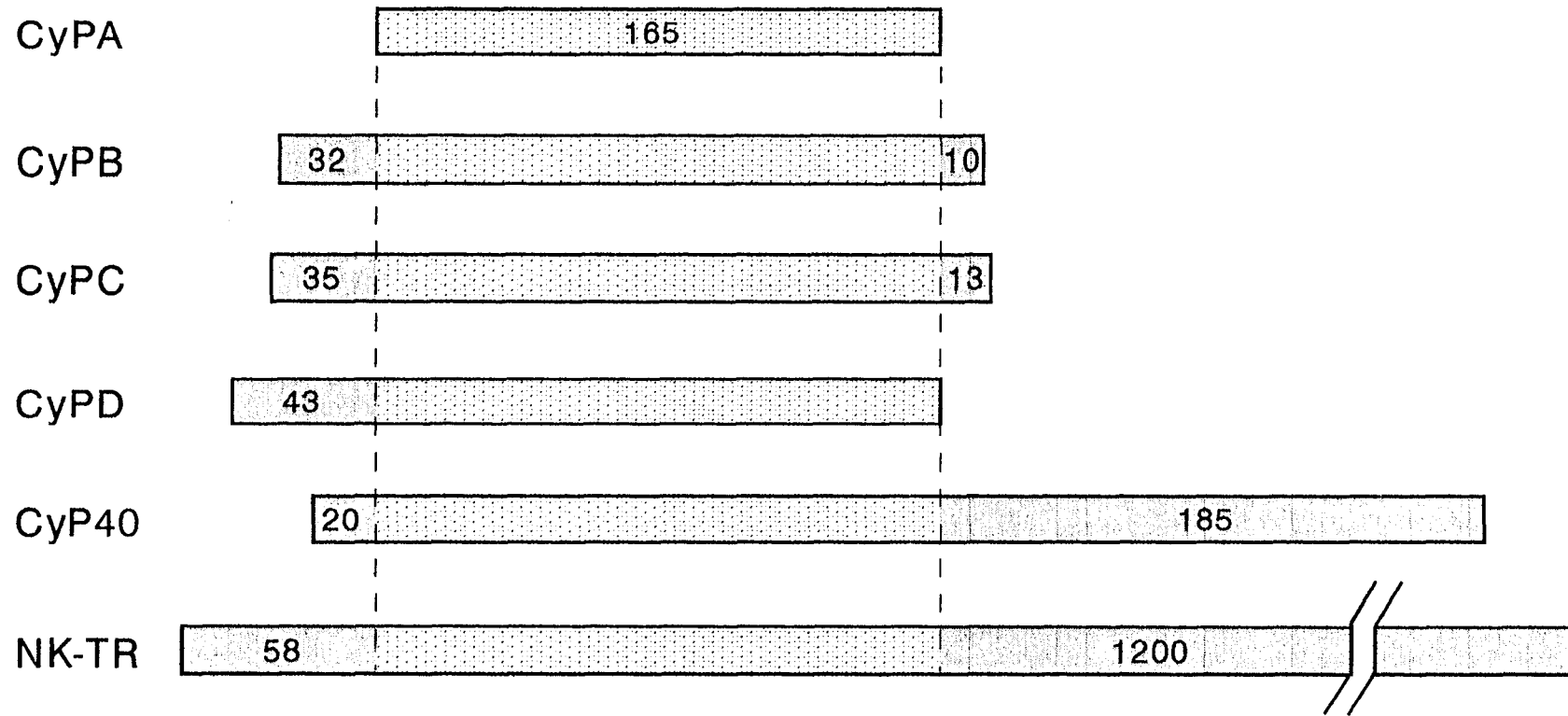


Figure 4 : Représentation schématique des différentes cyclophilines humaines

En conclusion de cette liste descriptive des différentes cyclophilines, nous pouvons retenir deux points essentiels qui auront leur importance dans les chapitres suivants, notamment en ce qui concerne les connaissances actuelles sur les rôles biologiques de ces protéines, et leur implication dans les mécanismes d'immunosuppression :

- les cyclophilines sont représentées dans toutes les structures subcellulaires et dans le milieu extracellulaire. Les régions non homologues des différentes cyclophilines, situées aux extrémités N- et/ou C-terminales du "noyau cyclophiline", sont étroitement liées à cette répartition, conférant sans doute à chaque isoforme des activités spécifiques en fonction de sa compartimentation.

- les études sur la localisation intracellulaire des différentes isoformes sont assez divergentes, voire quelquefois contradictoires. Ainsi, la CyPB est, selon certaines études, retenue dans les vésicules internes, alors qu'elle est retrouvée, selon d'autres études, tout au long du transit de sécrétion, associée à la membrane plasmique et sécrétée dans le milieu. Quant à la CyPA, elle serait presque partout. Elle est bien sûr très abondante dans le cytosol, mais certains auteurs l'ont décrite du noyau, associée au Golgi, et sans doute sécrétée. Cependant, il n'est pas exclu qu'une isoforme ait des localisations subcellulaires différentes selon les cellules ou les tissus étudiés. De plus, ces travaux sont souvent réalisés à l'aide d'anticorps polyclonaux. Etant donné le taux élevé d'homologie de structure entre les différentes cyclophilines, il est fort possible que des conclusions erronées soient dues à des problèmes de réactions croisées entre certaines isoformes.

II. Propriétés des cyclophilines.

Les propriétés des cyclophilines sont largement étudiées, en raison de leur implication dans les processus d'immunosuppression et de leur activité enzymatique originale. Leurs rôles dans la médiation de l'activité de la CsA et les mécanismes d'isomérisation des liaisons prolyls *in vitro* sont aujourd'hui mieux compris. Par contre, leurs fonctions biologiques *in vivo* restent encore obscures, les données étant souvent disparates et concernant le plus souvent des isoformes mineures. Ainsi, bien que la CyPA soit l'isoforme la plus abondante dans la cellule et la principale cible de la CsA, très peu de choses sont actuellement connues sur ses fonctions physiologiques dans la cellule.

A. Fixation de la cyclosporine

1. La cyclosporine

La cyclosporine a été isolée en 1969 par les Laboratoires Sandoz à partir d'une souche de champignon inférieur, le *Tolypocladium inflatum* (Borel *et al.*, 1976). Actuellement, elle est surtout produite comme métabolite secondaire par *Cylindrocarpon lucidum* et *Trichoderma polysporum* (Von Wartburg & Traber, 1986). Il a été dénombré au moins 25 composés naturels de cette molécule, mais seule la CsA est couramment utilisée pour ses propriétés pharmaceutiques.

La cyclosporine A est un peptide cyclique composé de onze acides aminés en majorité très hydrophobes. La molécule est composée d'une 4R-4[E-2-butenyl]-4-N-diméthyl-L-thréonine (MeBmt-1), d'un acide amino-butyrique (Abu-2), d'une sarcosine (Sar-3), de quatre N-méthyl-leucines (MeLeu-4, -6, -9- 10), d'une valine ((Val-5), de deux alanines (Ala-7 et D-Ala-8) et d'une N-méthyl-valine (MeVal-11).

Elle est couramment utilisée dans les thérapies de prévention de rejet de transplantation d'organes (rein, coeur, foie) et de greffe de moelle osseuse. Elle est également indiquée dans les traitements de certaines maladies auto-immunes, telles que le psoriasis, le diabète insulino-dépendant, les uvéites et les myasthénies.

Son mode d'action repose sur ses propriétés à inhiber sélectivement les réactions immunitaires à médiation cellulaire, notamment en bloquant la production et la libération de cytokines par les lymphocytes T auxiliaires (Borel, 1989).

2. Les complexes cyclophiline/cyclosporine A (CyP/CsA)

Les cyclophilines sont capables de fixer spécifiquement et réversiblement une molécule de CsA. Les premières études sur la formation du complexe ont montré que la fixation de la CsA est dépendante des groupements thiols de la protéine, instable à partir de 56°C et à des pH inférieurs à 4 ou supérieurs à 9,5. La constante de dissociation K_d a d'abord été évaluée à $2 \cdot 10^{-7}$ M (Handschumacher *et al.*, 1984), puis entre 10^{-8} et 10^{-9} M (Liu *et al.*, 1990).

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour étudier les propriétés de fixation de la CsA et ses dérivés avec les différentes isoformes des cyclophilines.

Ainsi, l'utilisation d'un conjugué sérum-albumine-CsA en ELISA et d'un dérivé diazirine photoactivable de la CsA, le PL-CS, a permis de montrer que CyPA et CyPB fixent les dérivés immunosuppresseurs CsA, CsG et CsM, mais pas les dérivés inactifs CsH et CsF, démontrant que l'activité immunosuppressive est bien liée à la fixation du médicament sur les cyclophilines (Ryffel *et al.*, 1993). Plus généralement, les modifications chimiques de résidus de CsA modifient sa fixation aux cyclophilines et/ou son activité immunosuppressive (Quesniaux *et al.*, 1988 ; Hsu *et al.*, 1990).

L'étude par diffraction aux rayons X et par RMN du complexe CypA/CsA montre que la fixation du médicament ne modifie pas la structure spatiale de la protéine (Thériault *et al.*, 1993 ; Pflügl *et al.*, 1993). Par contre, la conformation de la CsA complexée est modifiée. En solution, la CsA a une structure en feuillet β avec 4 ponts hydrogène, mais une fois complexée, elle perd ses ponts hydrogène et toutes ses liaisons amides s'orientent en *trans* (Loosli *et al.*, 1985 ; Weber *et al.*, 1991). Cependant, il se pourrait que cette forme tout *trans* préexiste déjà en solution en très faible proportion. Seule cette forme se fixerait alors à la cyclophiline, impliquant que la fixation elle-même ne modifie en rien la conformation de la CsA (Altschuh *et al.*, 1992). Un dérivé hydrosoluble de la CsA, la [D-Meser³-D-Ser -(O-Gly)⁸]-cyclosporine, a une structure en solution identique à celle de la CsA fixée à la cyclophiline. Cela suggère que les modifications de conformation de la CsA serait plus dues à son environnement en solution plutôt qu'à des contraintes imposées par sa fixation (Wenger *et al.*, 1994). Différents intermédiaires conformationnels de CsA sont observés quand le médicament se fixe à la cyclophiline ou à un fragment Fab d'anticorps anti-CsA. L'analyse de ces variations montre qu'il faut environ une heure pour que le maximum de complexe soit formé, ce qui correspond au temps nécessaire pour la transition totale de la CsA sous le conformère final tout *trans* (Zeder-Lutz *et al.*, 1993).

La conformation de la CsA est similaire associée à la CyPA ou à la CyPB (Mikol *et al.*, 1994) mais est légèrement différente associée à la CyPC, sans doute en raison de modifications conformationnelles à proximité du site de fixation (Ke *et al.*, 1993a). La fixation de la CsA a été étudiée par les variations de fluorescence du tryptophane situé dans le site de fixation. Les Kd sont ainsi estimés à 36,8 nM pour la CyPA, 9,8 nM pour la CyPB, et 90,8 nM pour la CyPC (Husi & Zurini, 1994).

Des expériences de mutagenèse dirigée de la CyPA montrent que les cystéines ne sont pas indispensables à la fixation de la CsA. Par contre, le tryptophane est indispensable (Liu *et al.*, 1990). Ces résultats sont confirmés par le fait que la CyPB ne possède pas de cystéine dans le site de fixation, et que le tryptophane est conservé dans toutes les cyclophilines d'origine eucaryote.

Le site de fixation de la CsA a été étudié par RMN en deux dimensions. Il est localisé dans la poche hydrophobe, a une structure en feuillets β et contient trois phénylalanines, le tryptophane et deux alanines (Hsu *et al.*, 1990). Les interactions entre CyPA et CsA, de distance inférieure à 0,4 nm, impliquent les résidus MeBmt-1, Abu-2, Sar-3 et MeLeu-9, MeLeu-10 et MeVal-11 (Fig. 5, p.29). Des liaisons hydrogènes sont formées entre la MeBmt-1 et la Glu-63, l'Abu-2 et l'Asn-102, la MeLeu-9 et le Trp121, la MeLeu-10 et l'Arg-55, la MeVal-11 et l'His-126 et l'Ala-7 et les Lys-31 et Glu-81 (Pflügl *et al.*, 1993 ; Thériault *et al.*, 1993).

B. Activité peptidyl prolyl *cis-trans* isomérase

1. Activité enzymatique des cyclophilines

Toutes les cyclophilines d'origine eucaryote ont une activité peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase (PPIase) (Fig. 6, p. 29), ou rotamase, inhibée par la fixation de la CsA (Fischer *et al.*, 1989). Cette inhibition serait due à l'homologie conformationnelle entre certains résidus de la CsA et l'état de transition *cis-trans* de la liaison Xaa-Pro. Par contre, ni le FK506, ni la rapamycine n'inhibent cette activité enzymatique, alors qu'ils bloquent l'activité rotamase des FKBP(s), suggérant une spécificité de substrat (Schönnbrunner *et al.*, 1991).

La rotamase isolée de rein de porc permet d'accélérer la renaturation de la ribonucléase dénaturée par l'urée. La réaction est inhibée par le Cu^{2+} , et est sensible aux pH acides et à la chaleur (Fischer & Bang, 1985). L'activité PPIase de la CyPA est sensible à la

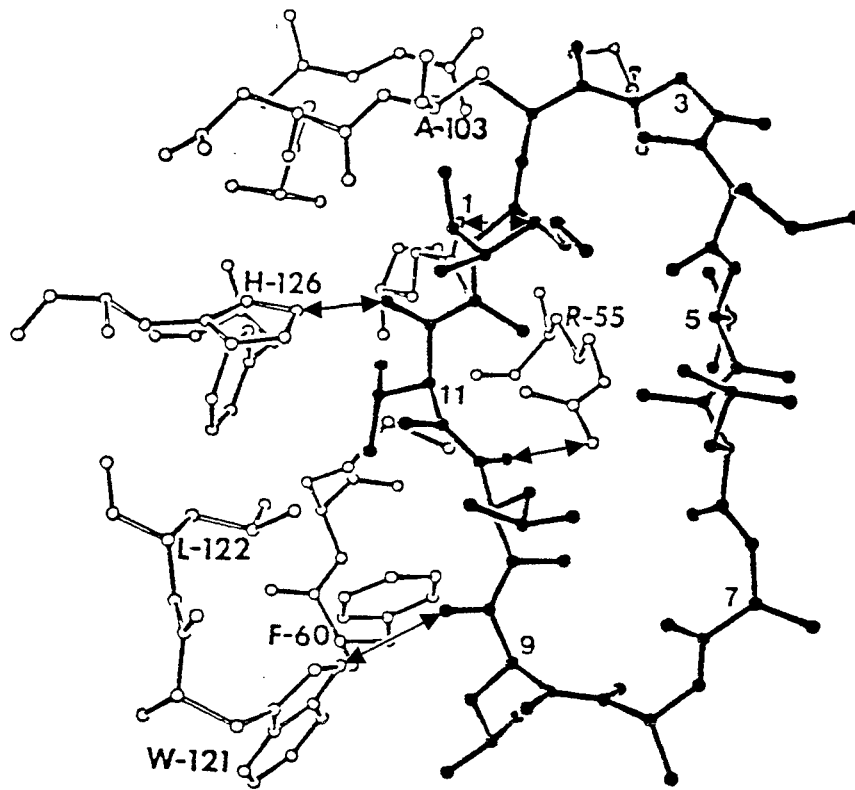


FIGURE 5 : Structure de la CsA (foncé) localisée dans le site catalytique de la CyPA (clair). Les doubles flèches correspondent aux ponts hydrogènes entre la CsA et son récepteur. (Walkinshaw *et al.*, 1992)

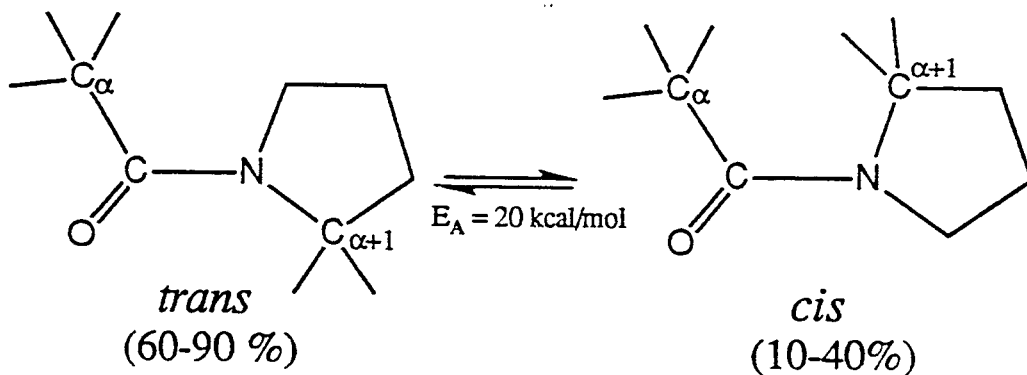


FIGURE 6 : Isomérisation *cis-trans* de la liaison prolyl

modification chimique des cystéines (Fischer *et al.*, 1989). Mais leur remplacement par mutagenèse dirigée ne modifie pas l'activité enzymatique, suggérant que les groupements chimiques ajoutés pour modifier les cystéines produisaient sans doute un encombrement stérique au niveau du site enzymatique (Liu *et al.*, 1990).

La CsA et le substrat synthétique acétyl-Ala-Ala-Pro-Ala-amidométhylcoumarine se fixent dans la même poche hydrophobe de la CyPA, suggérant que la CsA est un inhibiteur compétitif de l'activité rotamase. L'inhibition est principalement due à la fixation de la MeVal-11 dans la cavité du site catalytique en place du résidu proline du substrat (Altschuh *et al.*, 1992). Par contre, la spécificité pour l'acide aminé X de la liaison Xaa-Pro est relativement faible, quoique l'isomérisation est facilitée lorsque celui-ci est un résidu hydrophobe, et préférentiellement une alanine (Harrison & Stein, 1990).

L'étude par diffraction aux rayons X de la CyPA complexée au dipeptide Ala-Pro montre une association du substrat sous forme *cis*, alors qu'il est majoritairement sous forme *trans* en solution. Le mécanisme de fixation nécessite que le peptide soit désolvaté pour pouvoir se loger dans la poche hydrophobe de la CyPA. L'interaction est ensuite stabilisée par un pont hydrogène entre l'oxygène de la liaison amide et une molécule d'eau (Ke *et al.*, 1993b).

2. Mesures de l'activité rotamase

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour suivre l'activité enzymatique des cyclophilines. Ainsi, la renaturation de la ribonucléase était suivie par la récupération de son activité enzymatique (Fischer & Bang, 1985). L'utilisation du peptide N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-(4-nitroanilide) a permis de coupler l'isomérisation à son hydrolyse par la chymotrypsine. En effet, cette protéase ne libère le chromophore que si la liaison Ala-Pro est en *trans*, ce qui permet de suivre la réaction au spectrophotomètre (Fischer *et al.*, 1989). Puis, les réactions ont été étudiées par RMN du proton. Les études réalisées à l'aide de cette méthode performante a permis de confirmer les résultats précédents, et de montrer de façon plus précise que l'isomérisation *cis-trans* catalysée par les cyclophilines est plus complexe qu'un simple échange entre les deux formes et nécessite le passage par un conformère presque plan stabilisé par l'enzyme (Hübner *et al.*, 1991).

Les constantes d'inhibition de l'activité rotamase par la CsA ont été déterminées par mesure de la concentration du compétiteur permettant une inhibition de 50% de l'activité enzymatique (DI₅₀) (tableau 2, p. 31). Les valeurs varient beaucoup dans la littérature, selon la méthode de mesure et le substrat utilisé.

TABLEAU 2 : Constantes d'inhibition de l'activité rotamase des cyclophilines par la CsA..

| Protéine | DI ₅₀ (nM) | Références |
|----------|-----------------------|--|
| CyPA | 1,6-25 | Price <i>et al.</i> , 1991 Bergsma <i>et al.</i> ; 1991 |
| CyPB | 9-84 | Price <i>et al.</i> , 1991 Bram <i>et al.</i> , 1993 |
| CyPC | 6 | Bram <i>et al.</i> , 1993 |
| CyPD | 8 | Bergsma <i>et al.</i> , 1991 |
| CyP40 | 300 | Kieffer <i>et al.</i> , 1993 |
| NK-TR | 770 | Rinfret <i>et al.</i> , 1993 |

Globalement, il ressort de ces différents travaux que les quatre cyclophilines types sont très sensibles à la CsA, la plus sensible étant sans doute la CyPA.

Il existe même des cyclophilines résistantes à la CsA. Ainsi, l'activité PPIase du domaine cyclophiline du NK-TR a une DI₅₀ de 770 nM, contre 19 nM pour la CyPA dans les mêmes conditions expérimentales (Rinfret *et al.*, 1994). Quant aux cyclophilines procaryotes, elles sont pratiquement insensibles à la CsA. Ainsi, la cyclophiline périsplasmique d'*Escherichia coli* n'a que 34% d'homologies de séquence avec la CyPA humaine, et son Kd de fixation de la CsA est estimée à 3.4 µM (Hayano *et al.*, 1991). Par contre, le mutant F112W fixe la CsA avec un Kd de 170 nM, simplement par une mutation ponctuelle du site catalytique, faisant apparaître le résidu tryptophane spécifique des cyclophilines eucaryotes (Fejzo *et al.*, 1994).

L'activité catalytique des cyclophilines est exprimée par le rapport kcat/Km. Cette valeur varie de 1 à 10 µM⁻¹.s⁻¹ pour les principales isoformes de cyclophilines. Ainsi, elle est de 6,3 µM⁻¹.s⁻¹ pour la CyPB (Price *et al.*, 1991) et de 0,9 µM⁻¹.s⁻¹ pour la cyclophiline mitochondriale de rat (Connern & Halestrap, 1992). Par contre, le NK-TR a une activité très faible, puisque le kcat/Km n'est que de 74 µM⁻¹.s⁻¹ (Rinfret *et al.*, 1994).

3. Les différentes PPIases

La première activité PPIase a été caractérisée dans des extraits de cortex de rein de porc par Fischer *et al.*, en 1984. Ce n'est que plus tard que l'enzyme a été caractérisée comme étant la cyclophiline (Fischer *et al.*, 1989 ; Takahashi *et al.*, 1989). Dans la même

année, une autre rotamase fut caractérisée en recherchant le ligand du nouvel immunosuppresseur FK506 (Harding *et al.*, 1989 ; Siekerka *et al.*, 1989a). Rapidement, cette protéine permit de caractériser une seconde famille de peptidyl prolyl isomérase, les FKBP(s) ou macrophilines.

a. Les FKBP(s)

Tout comme les cyclophilines, les FKBP(s) ont une répartition phylogénétique et une distribution tissulaire très large. Par contre, les deux familles de protéines n'ont pas d'homologies de structure et possèdent des affinités différentes pour des substrats artificiels, suggérant des cibles cellulaires différentes. Ainsi, le FK506 pourrait mimer l'état de transition d'une liaison Leu-Pro (Harrison & Stein, 1990 ; Albers *et al.*, 1990).

Les FKBP(s) sont représentées dans les cellules humaines par au moins quatre isoformes (tableau 3).

TABLEAU 3 : Localisation des FKBP(s) et constantes d'inhibition de leur activité enzymatique par le FK506.

| Protéine | Localisation | DI ₅₀ (nM) | Références |
|----------|---------------|-----------------------|--|
| FKBP-12 | cytosol | 1,7 | Siekerka <i>et al.</i> , 1989b Harrison & Stein, 1990 |
| FKBP-13 | membrane R.E. | 55 | Jin <i>et al.</i> , 1991 |
| FKBP-25 | noyau | 160 | Galat <i>et al.</i> , 1992 Jin <i>et al.</i> , 1992 Rivière <i>et al.</i> , 1993 |
| FKBP-52 | cytosol | 10 | Peattie <i>et al.</i> , 1992 |

Chez le poulet, deux formes de FKBP(s) sont associées au récepteur de la progestérone, la p50 et la p54. Alors que la p50 est équivalente à la FKBP-52 humaine, la p54 correspond à une nouvelle isoforme, et des anticorps contre cette protéine reconnaissent un équivalent de 54 kDa chez le lapin (Smith *et al.*, 1993).

Généralement, toutes les valeurs de DI₅₀ sont plus élevées en présence de rapamycine, suggérant que ce macrolide est moins affine que le FK506 pour les FKBP(s).

Comme pour les complexes entre cyclophilines et CsA, les FKBP(s) reconnaissent le FK506 ou la rapamycine par homologie de structure avec l'état de transition *cis-trans* de la liaison prolyl. Pourtant, la CsA ne se fixe pas au FKBP(s), ce qui laisse supposer une spécificité plus étroite (Rosen & Schreiber, 1992).

b. Les parvulines

Une nouvelle rotamase de 10 kDa a été caractérisée et partiellement séquencée dans *Escherichia coli*. Son activité enzymatique n'est pas inhibée ni par la CsA, ni par le FK506, aux concentrations couramment utilisées pour inhiber les autres rotamases d'*E. coli*. La partie N-terminale ne présente aucune homologie de séquence avec les cyclophilines ou les FKBP(s), ni avec aucune autre protéine connue. Par contre, l'affinité pour les substrats synthétiques est similaire à celle des FKBP(s) (Rahfeld *et al.*, 1994). La comparaison des séquences nucléotidiques a permis de caractériser une nouvelle famille de rotamases dans les cellules procaryotes et eucaryotes, mais les protéines correspondantes restent à être identifiées (Rahfeld *et al.*, 1994b ; Rudd *et al.*, 1995).

C. Rôles biologiques des cyclophilines

1. Mise en conformation des protéines.

Les cyclophilines accélèrent la renaturation de protéines *in vitro* et l'isomérisation *cis-trans* de peptides synthétiques. Il a donc été proposé qu'elles devaient intervenir *in vivo* dans la mise en conformation des protéines néosynthétisées (Lang *et al.*, 1987). Cependant, les activités prolyl-isomérase (PPI) et disulphide-isomérase (PDI) catalysent la mise en conformation *in vitro* des protéines de façon différente et indépendante (Lang & Schmid, 1988). De plus, il semble exister une certaine spécificité de substrat, puisque la CyPA catalyse *in vitro* l'isomérisation d'une seule des deux liaisons prolyls de la calcitonine, hormone peptidique intervenant dans le métabolisme du Ca^{2+} (Kern *et al.*, 1993).

Quelques travaux suggèrent un rôle probable des cyclophilines *in vivo* dans la mise en conformation des protéines en cours de synthèse. Ainsi, la CsA ralentit la mise en conformation du procollagène I et provoque des modifications post-translotionnelles dans les cellules de poulet. Elle provoque une augmentation de l'hydroxylation sur les résidus de lysine, une dégradation intracellulaire plus importante et une diminution de la production des collagènes I et III dans les fibroblastes humains (Steinmann *et al.*, 1991). De la même

façon, la CsA ralentit la mise en conformation de la transferrine et sa sécrétion à partir d'une lignée hépatocytaire (Lodish & Kong, 1991). Il semble donc qu'une ou plusieurs cyclophilines soient impliquées dans la mise en conformation et la sécrétion de ces protéines, mais ces travaux ne permettent pas de savoir si elles interviennent directement dans ces processus.

Un rôle direct dans la mise en conformation des protéines a été démontré pour la cyclophiline NinaA. En effet, la mutation du gène *ninaA* provoque une déficience dans le signal de transduction visuel, par une mauvaise synthèse des rhodopsines Rh1 et Rh2 du photorécepteur de la rétine de drosophile (Stammes *et al.*, 1991).

Par contre, l'activité immunosuppressive n'est pas due à une maturation défectueuse de facteurs indispensables à l'activation du lymphocyte T. En effet, le taux de CsA suffisant pour inhiber l'activation des lymphocytes T est très inférieur à celui nécessaire pour saturer les cyclophilines présentes dans la cellule et bloquer leur activité enzymatique (Schreiber, 1991).

Les cyclophilines ne sont pas indispensables à la viabilité des organismes inférieurs. En effet, la délétion des gènes codant pour *CYP1* et *CYP2* chez la levure (Koser *et al.*, 1991) et les mutations défectueuses chez *N. crassa* et *S. cerevisiae*, n'affectent pas la viabilité des cellules (Tropschug *et al.*, 1989). Cependant, en cas de stress, le taux d'ARNm de la *CYP1* est multiplié par deux à trois, ce qui peut s'expliquer par la présence dans le promoteur du gène de cette cyclophiline d'une séquence consensus de réponse au stress, comme chez les HSP(s). De plus, les mutants *CYP1*- et *CYP2*- sont sensibles aux chocs de températures, ce qui suppose que ces protéines ont un rôle de HSP chez la levure (Sykes *et al.*, 1993).

Une activité chaperone a été suggérée pour la CyPA. En effet, elle interviendrait dans la mise en conformation correcte de l'anhydrase carbonique *in vitro*, en réduisant l'agrégation des polypeptides incomplètement conformés. La CsA inhibe cette activité, suggérant que le site catalytique est impliqué dans cette propriété (Freskgard *et al.*, 1992). Le domaine N-terminal du NK-TR a également une activité chaperone associée à son activité PPIase (Rinfret *et al.*, 1994), ainsi que la CyPB qui accompagnerait les protéines en cours de sécrétion jusqu'à la surface cellulaire (Price *et al.*, 1994). Cependant, l'activité chaperone des cyclophilines est très controversée. En effet, les cyclophilines interviennent dans la mise en conformation de fragments Fab d'anticorps par deux mécanismes différents. En tant que catalyseurs spécifiques, elles accélèrent l'étape limitante de l'isomérisation *cis-trans* des liaisons Xaa-Pro. Elles réduisent également la formation d'agrégats et l'adsorption

sur le support. Cependant, cette dernière propriété n'est pas due à une activité chaperone spécifique, mais plutôt à un effet de protection, car le même effet est observé en présence de séralbumine bovine (Lilie *et al.*, 1993). Enfin, des travaux récents montrent que les mécanismes enzymatiques impliqués dans la renaturation de l'anhydrase carbonique ne font intervenir que l'activité isomérase des cyclophilines, et pas d'activité chaperone associée qui consisterait à protéger des conformères intermédiaires nécessaires au repliement progressif de la chaîne (Kern *et al.*, 1994).

2. Les récepteurs des cyclophilines

Alors que les différentes études sur l'activité enzymatique des cyclophilines *in vitro* leur accordaient volontiers une fonction générale dans la mise en conformation *in vivo* des protéines, les travaux récents montrent que ces enzymes interagissent de façon très spécifique avec des cibles cellulaires le plus souvent déjà conformées. Ainsi, les cyclophilines pourraient intervenir dans la régulation de mécanismes cellulaires, tout comme les systèmes phospho-déphospho.

a. Les protéines de stress

La CyPA est sélectivement retenue par la HSP90 en chromatographie d'affinité. La fixation n'est pas inhibée en présence de CsA, suggérant que le site catalytique de l'enzyme n'est pas impliqué dans ces interactions (Nadeau *et al.*, 1993). La CyP40 est une sous-unité du complexe récepteur inactif des stéroïdes et est associée entre autres aux protéines HSP70 et HSP90 (Peattie *et al.*, 1992).

b. Le récepteur CAML

La méthode du double hybride chez la levure permet de caractériser des interactions protéine-protéine spécifiques. Brièvement, le ligand étudié est fusionné au domaine de fixation à l'ADN d'un facteur de transcription et les récepteurs potentiels sont associés au domaine activateur du même facteur de transcription. Seule l'association ligand-récepteur permettra la transcription du gène rapporteur rendu indispensable à la croissance de la levure. Ainsi, cette technique permet de sélectionner directement les clones de levures ayant reçu l'ADNc d'une protéine interagissant spécifiquement avec le ligand étudié.

Cette méthode a été utilisée pour la CyPB et a permis de caractériser au moins dix récepteurs potentiels de cette cyclophiline. La surexpression d'une des protéines caractérisées induit la transcription du gène de l'IL-2 dans Jurkat, par activation des facteurs

de transcription NF-AT et NF-IL2A. Cette protéine, nommée "calcium-signal modulating cyclophilin ligand" (CAML), intervient dans la voie de transduction du signal de transcription du gène de l'IL-2, en aval du récepteur TCR/CD3, mais en amont de la calcineurine. En association avec la CyPB, la CAML régulerait l'activité de la calcineurine en intervenant au niveau des flux calciques, et non en agissant de façon directe avec cette phosphatase. Ainsi, la CyPB et son récepteur contrôleraient une nouvelle étape dans les mécanismes de transduction Ca^{2+} -dépendants.

La CAML est une protéine de 296 acides, de masse moléculaire de 33 kDa. Elle est spécifique de la CyPB, et n'interagit ni avec les CyPA ou CyPC, ni avec la calcineurine. Elle est présente dans tous les tissus testés, mais est particulièrement abondante dans le cerveau et les testicules. Son ADNc code pour un peptide signal qui dirigerait la protéine dans la membrane du réticulum endoplasmique. Elle est formée d'un grand domaine cytosolique, de trois domaines transmembranaires en position C-terminale et d'un court domaine dirigé dans la lumière du réticulum. En microscopie de fluorescence, la CAML apparaît dans des structures membranaires intracellulaires similaires aux calciosomes décrits par Arber *et al.*, (1992) pour la CyPB. Ainsi, CyPB et CAML pourraient intervenir dans la régulation de la sécrétion du calcium dans le cytosol, en contrôlant l'ouverture des canaux calciques membranaires.

A côté de la CAML, neuf autres protéines reconnaissant de façon spécifique la CyPB ont été caractérisées, mais aucun rôle n'a encore pu leur être attribué. Par contre, une autre protéine isolée reconnaît aussi bien la CyPA et la CyPB et serait en fait la β -tubuline (Bram & Crabtree, 1994).

c. Le récepteur CyCAP

Une colonne d'affinité CyPC-glutathione-S-transférase (CyPC-GST) retient spécifiquement une protéine de 77 kDa à partir d'un lysat cellulaire de la lignée lymphoblastique murine AC-6, et une protéine de 70 kDa à partir d'un lysat de Jurkat. Ces protéines ne sont pas retenues en présence de CsA, suggérant que le site catalytique de la CyPC est impliqué dans les interactions avec ces protéines (Friedman & Weissman, 1991).

La purification de la p77 a permis de caractériser trois autres protéines mineures de 60, 37 et 25 kDa reconnaissant spécifiquement la CyPC. Cependant, les p60 et p37 correspondent sans doute à des produits dérivés de la p77, puisque leur séquençage partiel montre de fortes homologues de structure et le criblage d'une banque d'ADNc n'a permis d'isoler qu'un seul clone. Le produit de l'ADNc correspond à une protéine transmembranaire

glycosylée de 574 acides aminés, de masse moléculaire 77 kDa. Elle possède un domaine riche en cystéine, commun à d'autres protéines membranaires, mais le reste de la protéine n'a pas d'homologie avec une protéine connue. Ce récepteur spécifique de la CyPC a été nommé CyCAP pour Cyclophiline C-Associated Protein (Friedman *et al.*, 1993).

Bien que la CsA inhibe la fixation de la CyPC, les CyPA et CyPB ne reconnaissent pas la CyCAP, suggérant que le site de fixation de l'immunosuppresseur est nécessaire, mais pas suffisant pour les interactions. Cette hypothèse est confirmée par des études de diffraction aux rayons X de la CyPC montrant la présence d'une boucle spécifique à proximité du site de fixation de la CsA (Gln-179 à Thr-189). Ce repliement ne gêne pas la fixation de la CsA, mais pourrait être impliqué dans les interactions avec la CyCAP, ce qui expliquerait que CyPA et CyPB, dépourvues de cette boucle, ne peuvent interagir avec la CyCAP. Par contre, la proximité de cette région avec le site de fixation de la CsA expliquerait que le médicament inhibe la fixation de la CyPC à son récepteur (Ke *et al.*, 1993a).

d. Le canal ADP/Ca²⁺ mitochondrial

La CsA inhibe le fonctionnement du canal ADP-Ca²⁺ mitochondrial (Szabo & Zoratti, 1991). L'ouverture de ce canal nécessite l'interaction entre une cyclophiline de la matrice mitochondriale, sans doute la CyPD, et l'adénine nucléotide translocase (Griffiths & Halestrap, 1991). La CsA inhibe l'ouverture, mais pas l'activité de transport du canal, suggérant que la cyclophiline intervient uniquement au niveau du signal d'ouverture (Connern & Halestrap, 1994).

e. Les rhodopsines

La rhodopsine Rh1 de rétine de drosophile est co-purifiée avec la cyclophiline NinaA, les deux protéines formant un complexe très stable. Par contre, le complexe ne peut être reconstitué *in vitro* avec les deux protéines isolées, ce qui suggère que NinaA interagit avec Rh1 dans une étape précoce de la mise en conformation de la protéine. La délétion du gène *ninaA* provoque une accumulation de la rhodopsine dans le réticulum endoplasmique, et inversement, sa surexpression augmente le taux de Rh1 mature à la surface des cellules. De plus, NinaA est recyclée vers le réticulum et s'associe de nouveau avec des molécules de Rh1 néosynthétisées. Ces résultats suggèrent que NinaA agit comme une chaperone spécifique de Rh1 et l'escorte jusqu'à la surface cellulaire (Baker *et al.*, 1994).

f. La protéine gag du HIV

La protéine Gag des rétrovirus est impliquée dans l'étape d'assemblage de la capside. La méthode du double hybride chez la levure a été utilisée pour rechercher des protéines humaines susceptibles d'interagir avec la protéine Gag du virus HIV de type I, et a permis de caractériser les CyPA et CyPB. Cette interaction est spécifique et inhibée en présence de CsA (Luban *et al.*, 1993). Les protéines Gag d'autres rétrovirus n'interagissent pas avec les cyclophilines, ce qui peut s'expliquer par la présence d'un domaine N-terminal spécifique au virus HIV-I caractérisé par la présence de quatre prolines consécutives. La CyPA est incorporée *in vivo* dans la capside du virus en même temps que la protéine Gag, sauf après délétion du domaine riche en proline (Franke *et al.*, 1994 ; Thall *et al.*, 1994). Etant donné que la CsA inhibe cette interaction et l'encapsidation *in vitro* du virus, le médicament ou ses dérivés ont été proposés pour inhiber la croissance du HIV chez l'Homme. Cependant, cela nécessiterait d'inhiber totalement l'activité PPIase de la CyPA, et donc d'utiliser des doses de CsA nettement supérieures à celles utilisées pour l'immunosuppression et sûrement toxiques. De plus, l'inhibition de l'activité PPIase ne serait sans doute pas sans effet sur le métabolisme normal des cellules (Cullen & Heitman, 1994).

Les principales protéines interagissant spécifiquement avec les cyclophilines sont reportées dans le tableau 4, p. 44.

g. Les récepteurs des FKBP(s)

La découverte de protéines spécifiques, voire de récepteurs, interagissant avec les différentes isoformes de cyclophilines vont à l'encontre d'un rôle général des PPIases dans la mise en conformation des protéines. La mise en évidence d'interactions entre les FKBP(s) certaines protéines spécifiques suggère que chaque isoforme a au moins une fonction particulière malgré leur activité catalytique commune. Cette spécificité peut s'expliquer soit par la compartimentation différente des différentes isoformes de cyclophilines et de FKBP(s), soit par l'implication des régions non homologues de ces enzymes dans des interactions spécifiques.

La FKBP12 s'associe au récepteur ryanodine, suggérant qu'il peut intervenir dans des modifications de conformation et la régulation de l'ouverture de ce canal calcique (Jayaraman *et al.*, 1992). Par la technique du double hybride chez la levure, il a également été montré que le FKBP12 se fixait de façon spécifique au domaine cytosolique du récepteur TGF- β de type I, le FK506 inhibant cette fixation (Wang *et al.*, 1994).

La FKBP25 est localisée dans le noyau en association avec la caséine kinase II et la nucléoline, mais la rapamycine n'inhibe pas cette interaction, suggérant que le site enzymatique reste libre et n'est pas impliqué dans ces interactions (Jin & Burakoff, 1993).

La FKBP52 est associée au récepteur des glucocorticoïdes, tout comme la CyP40 (Peattie *et al.*, 1992). Il est intéressant de noter que ce récepteur de stéroïdes possède des sous-unités capables de fixer trois molécules à activité immunosuppressive, la CsA, les macrolides, et les glucocorticoïdes.

3. Activités particulières des cyclophilines

a. Activité chimiotactile

La p18 isolée d'utérus de rat et la CyPA recombinante ont la même activité chimiotactile *in vitro* pour les éosinophiles et les neutrophiles, avec une efficacité maximale à 10 nM. Elles provoquent également la dégranulation des éosinophiles, avec libération importante de l'activité peroxydase. Ces activités sont inhibées par la CsA, mais pas par des dérivés non immunosuppresseurs de ce médicament (Xu *et al.*, 1992). Des travaux similaires montrent que la sp18 sécrétée par les macrophages activés de souris et la CyPA ont des activités pro-inflammatoires *in vivo*, et chimiotactiles pour les monocytes et les neutrophiles, avec une activité maximale à 25 nM (Sherry *et al.*, 1992).

b. Activité mitogène

La CyPB d'embryon de poulet a une activité facteur de croissance pour les cellules embryonnaires de la moelle épinière. Elle est également mitogène pour les fibroblastes et les cellules de coeur de poulet, mais à une concentration de 500 nM, ce qui est relativement élevée pour un facteur de croissance (Caroni *et al.*, 1991). Une activité mitogène de la CyPB isolée du lait de Femme a également été observée pour les fibroblastes de la lignée CCL-29, mais n'a pas été retrouvée avec la CyPB recombinante, suggérant que cette activité était sans doute due à la présence d'un contaminant du lait (Spik *et al.*, 1991).

c. Activité nucléasique

Dans les lymphocytes, une des étapes de l'apoptose est le clivage de l'ADN par une nucléase dépendante du calcium. La NUC18, protéine nucléaire isolée de thymocytes de rat traités aux glucocorticoïdes est une protéine de 18 kDa et semble associée à ce processus. Le séquençage partiel de cette protéine montre de fortes homologues de séquence avec les

cyclophilines. Les CyPA, B et C ont été testées pour leur capacité à cliver l'ADN *in vitro*. Il en ressort que ces trois cyclophilines sont capables d'hydrolyser l'ADN tout comme la NUC18, et que cette activité est dépendante du calcium et du magnésium (Montague *et al.*, 1994).

D. Les cyclophilines et la calcineurine

1. La calcineurine

La calcineurine, ou protéine phosphatase 2B (PP2B), est une sérine/thréonine phosphatase dépendante du Ca^{2+} . Elle est présente dans la majorité des cellules de l'organisme à un taux variable. Elle est très abondante dans les cellules nerveuses et exprimée à un taux relativement bas dans les lymphocytes T (Kincaid *et al.*, 1987). Elle est formée de deux sous-unités, la calcineurine A de 60 kDa et la calcineurine B de 19 kDa, associée et co-régulée par la calmoduline.

La calcineurine A possède une région centrale ayant de fortes homologies avec les autres sérine/thréonine protéines-phosphatases et correspondant au site catalytique de l'enzyme. L'extrémité C-terminale contient le site de fixation de la calmoduline et un site d'auto-inhibition, qui bloque l'activité de l'enzyme en absence de Ca^{2+} (Hashimoto *et al.*, 1986). Le domaine N-terminal est riche en proline (Swanson *et al.*, 1992). Elle est exprimée dans les différents tissus par deux isoformes, AI et AII, produites par épissage alternatif d'un gène commun (Guerini & Klee, 1989). La calcineurine B est la sous-unité allostérique de régulation et contient un domaine de fixation du calcium.

La surexpression de la calcineurine dans les lymphocytes augmente la résistance de ces cellules à l'action de la CsA (Clipstone & Crabtree, 1992 ; O'Keefe *et al.*, 1992). Or le NF-AT est un substrat potentiel de la calcineurine, et sa déphosphorylation permet sa translocation dans le noyau, et l'activation spécifique du gène de l'interleukine 2. Il a donc été suggéré que le blocage de cette étape cruciale de déphosphorylation serait à l'origine de l'action de la CsA (Flanagan *et al.*, 1991).

2. Fixation spécifique des complexes immunosuppresseurs

Par chromatographie d'affinité, les complexes CsA/CyPA et CsA/CypC retiennent de façon spécifique un complexe formé de trois protéines à partir d'extraits de cerveau et de thymus de boeuf. Deux de ces protéines correspondent aux sous-unités A et B de la

calcineurine, et la troisième à la calmoduline. *In vitro*, l'activité phosphatase de cette enzyme est inhibée par les deux complexes, mais pas par les CyPA et CyPC seules, ni par la CsA (Friedman & Weissman, 1991 ; Liu *et al.*, 1991). Le complexe CyPB/CsA se fixe également à la calcineurine et possède un potentiel inhibiteur deux fois plus important que le complexe CyPA/CsA, suggérant que des acides aminés des cyclophilines sont impliqués dans les interactions (Swanson *et al.*, 1992). Le complexe CyPB/CsA a une constante d'inhibition K_i de 20 nM, alors qu'elle est de 40 nM pour CyPA/CsA et de 37 nM pour CyPC/CsA (Bram *et al.*, 1993). Des travaux similaires donnent des écarts beaucoup plus importants. Les DI_{50} seraient de 720 nM et de 255 nM pour les complexes CyPA/CsA et CyPC/CsA, alors qu'elle ne serait que de 17 nM pour le complexe CyPB/CsA (Fliri *et al.*, 1993).

L'utilisation de composés bifonctionnels, permettant un pontage covalent entre la CsA, les cyclophilines et la calcineurine, montre que la CsA se fixe bien aux cyclophilines, mais pas à la calcineurine seule. Par contre, en présence de CyPA ou de CyPB, une interaction calcineurine-cyclosporine est détectable. Le complexe ternaire est formé de CyPA ou CyPB, de CsA et de calcineurine en quantité équimolaire, démontrant que l'immunosuppresseur a deux sites actifs, un site de fixation aux cyclophilines et un site d'interaction avec la calcineurine. La formation du complexe est dépendante du Ca^{2+} , mais pas de la calmoduline, et seule la calcineurine A est liée covalentement aux complexes CyP(s)/CsA (Ryffel *et al.*, 1993). Cependant, des travaux similaires montrent que le complexe CypA/CsA s'associe avec la sous-unité B régulatrice de la calcineurine, mais pas avec la sous-unité A. Par contre, la fixation nécessite la présence de la calcineurine A (Li & Handschumacher, 1993). Bien que contradictoires, ces travaux montrent qu'il y a formation d'un complexe comprenant la CsA, une cyclophiline, les sous-unités A et B de la calcineurine, résultant en l'inhibition de l'activité enzymatique de cette phosphatase.

Bien que le domaine riche en proline de la calcineurine A puisse être un substrat pour les cyclophilines, aucune fixation n'est observée en absence de CsA. De même, les complexes CyP(s)/CsA ne se fixent pas au niveau du site catalytique de la phosphatase, et seraient plutôt des inhibiteurs non compétitifs (Liu *et al.*, 1991). Cette hypothèse est confirmée par des études enzymatiques (Etzkorn *et al.*, 1994), et de mutagenèse dirigée (Milan *et al.*, 1994). Ainsi, la modification de la sous-unité B régulatrice conserve son activité phosphatase à la calcineurine mais rend l'enzyme résistante aux complexes immunosuppresseurs. L'inhibition de l'activité phosphatase serait donc due à un blocage de l'activité allostérique de la calcineurine B, et non à une interaction des complexes

CyP(s)/CsA avec le site catalytique de l'enzyme. Cependant, des travaux récents, réalisés par la méthode du double hybride, suggèrent une interaction entre la CyPA et la calcineurine, en absence de CsA. Cette interaction impliquerait le site catalytique de la CyPA, et serait paradoxalement renforcée en présence de CsA (Cardenas *et al.*, 1995).

3. Interactions calcineurine-CsA-cyclophiline

Les mutations de la CyPA humaine en Arg-69, Lys-125, et Arg-148 ne modifient ni l'activité enzymatique, ni la capacité de fixation de la CsA, mais altèrent la formation du complexe ternaire avec la calcineurine. Ainsi, la mutation Arg-69-Glu de la CyPA augmente la DI_{50} du complexe pour la calcineurine. Par contre, la mutation Arg-148-Glu améliore le K_i , qui devient voisin de celui du complexe CyPB/CsA. Cela montre bien que la calcineurine reconnaît un motif composite des cyclophilines et de la CsA, faisant intervenir des résidus des deux molécules (Etzkorn *et al.*, 1994). Des travaux similaires montrent que la différence d'inhibition du complexe CyPB/CsA par rapport au complexe CyPA/CsA est due à des interactions plus fortes de la calcineurine avec le complexe CyPB/CsA par l'intermédiaire des résidus Arg-90, Lys-113, Ala-128 et de la boucle contenant l'Arg-158, spécifiques de la CyPB (Mikol *et al.*, 1994).

Les résidus de la CsA impliqués dans les interactions avec la calcineurine sont les MeLeu-4, Val-5, et MeLeu-6 (Schreiber & Crabtree, 1992). Ainsi, des dérivés en 4 de la CsA modifient l'inhibition de la prolifération des lymphocytes activés *in vitro* et la transcription du gène de l'IL2 (Papageorgiou *et al.*, 1994). Des analogues de CsA, comme la [MeAla⁶]-cyclosporine, se fixent bien aux cyclophilines mais n'ont pas d'activité immunosuppressive. En effet, ils forment des complexes qui ne se fixent pas à la calcineurine et n'inhibent pas son activité. Par contre, le composé [MeBm₂₁¹]-cyclosporin se fixe mal aux cyclophilines, et les complexes sont suffisamment efficaces pour inhiber la calcineurine (Nelson *et al.*, 1993 ; Liu *et al.*, 1992).

Ces travaux démontrent que des résidus de la CsA et des cyclophilines sont directement impliqués dans les interactions avec la calcineurine, et que les complexes formés ont des affinités différentes en fonction des isoformes de cyclosporine et de cyclophiline.

Des études en RMN et diffraction aux rayons X du complexe CyPA/CsA montrent qu'une partie du médicament est ancré dans le site actif de la rotamase et que le reste de la molécule est exposé au solvant. Cette partie va former un nouveau motif composite avec la surface de la cyclophiline et interagir avec certains acides aminés de la calcineurine (Rosen

& Schreiber, 1992 ; Liu, 1993). La reconnaissance de ce nouveau motif artificiel expliquerait que le complexe FKBP/FK506 se fixe aussi à la calcineurine, alors que ni le FK506, ni la FKBP n'ont d'homologie avec la CsA pour le premier, et les cyclophilines pour la seconde. En fait, il y aurait homologie conformationnelle entre les deux motifs composites des complexes immunosuppresseurs.

Des expériences de délétion de certaines séquences de la calcineurine A ont permis de mieux visualiser le site d'interaction entre la calcineurine et les complexes CyP(s)/CsA. Ainsi, les sites d'auto-inhibition et de fixation de la calmoduline ne sont pas nécessaires à la formation du complexe ternaire. Par contre, une partie du site catalytique de la calcineurine A est directement impliquée dans les interactions. La présence de la calcineurine B est indispensable, mais cette sous-unité seule n'est pas suffisante pour former un complexe (Haddy *et al.*, 1992 ; Swanson *et al.*, 1992 ; Clipstone *et al.*, 1994). Par mutagenèse dirigée, la région de la calcineurine A interagissant directement avec les complexes CyP(s)/CsA a pu être localisée (fig. 7, p. 43) Ce domaine comprend la séquence comprise entre les résidus 332-390, contient le site d'interaction avec la calcineurine B (332-357), et se termine juste avant le domaine de fixation de la calmoduline, confirmant que la présence de la sous-unité B est nécessaire pour les interactions avec les complexes CyP(s)/CsA, mais pas celle de la calmoduline (Husi *et al.*, 1994).

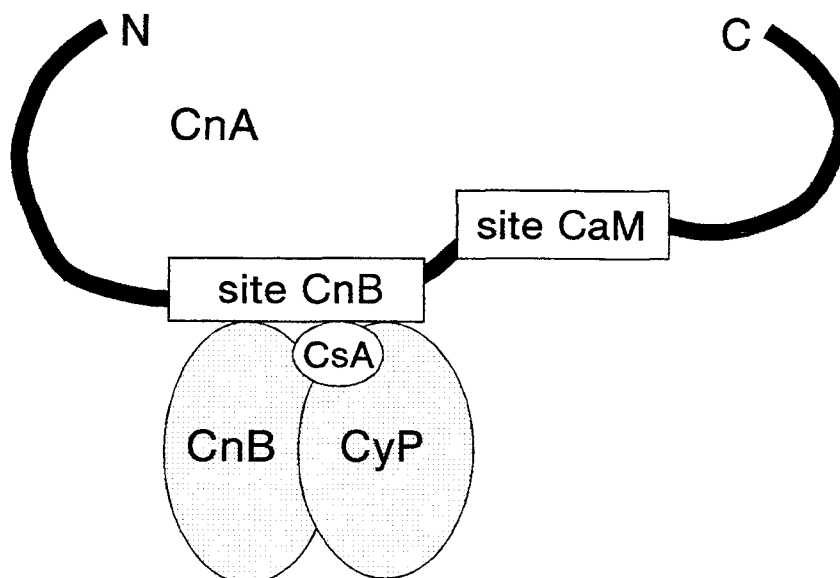


FIGURE 7 : Interactions entre le complexe CyP/CsA et les sous-unités A (CnA) et B (CnB) de la calcineurine (Husi *et al.*, 1994).

TABLEAU 4 : Les protéines et récepteurs potentiels fixant les cyclophilines.

| Protéine | Localisation | Ligand | Référence |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------|---|
| HSP90 | Cytosol | CyPA | Nadeau <i>et al.</i> , 1993 |
| CAML | Membrane R.E. | CyPB | Bram & Crabtree, 1994 |
| CyCAP | Membrane | CyPC | Friedman <i>et al.</i> , 1993 |
| Récepteur glucocorticoïdes | Cytosol | CyP40 | Kieffer <i>et al.</i> , 1993 |
| Gag HIV-1 | Virus | CyPA CyPB | Luban <i>et al.</i> , 1993 |
| Calcineurine | Cytosol | CyP(s)-CsA CyPA | Liu <i>et al.</i> , 1991 Swanson <i>et al.</i> , 1992 Cardenas <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Rétention R.E</i> | Membrane R.E. | CyPB | Arber <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Chimiotactisme</i> | Membrane plasmique | CyP18/CyPA | Sherry <i>et al.</i> , 1991 Xu <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Facteur de croissance</i> | Membrane plasmique | CyPB | Caroni <i>et al.</i> , 1991 |

LA CYCLOSPORINE A ET L'IMMUNITÉ DE GREFFE

I. Le rejet de greffe

Le destin d'une greffe dépend, dans une large mesure, des différences de compatibilité entre le donneur et l'accepteur. Si l'on excepte les cas très particuliers des autogreffes, où le greffon provient du futur transplanté, et des greffes syngéniques, où donneur et accepteur sont génétiquement identiques, la majorité des greffes concernent des individus différents, d'où le terme de greffe allogénique, et nécessitent des traitements immunosuppresseurs afin de prévenir un inévitable rejet.

La CsA agit essentiellement en s'opposant à l'activation des cellules T, élément clé de la réaction de rejet de greffe. En effet, les lymphocytes T jouent un rôle central, soit comme cellules inductrices de la réponse immune, soit comme cellules effectrices. Le rejet aigu est donc essentiellement le fait de ces lymphocytes responsables de la cytotoxicité à médiation cellulaire ainsi que des réactions d'hypersensibilité retardée.

A. Les antigènes de l'alloreconnaissance.

Toute allogreffe est constituée comme une mosaïque de cellules présentant des antigènes d'histocompatibilité de classe I et de classe II (CMH-I et CMH-II) (Bevan, 1977). Ces antigènes sont polymorphes et résultent de l'expression d'au moins six loci dont chacun peut être codé par des dizaines d'allèles différents chez l'Homme. Ce polymorphisme représente un avantage dans la sélection spécifique, puisque ces molécules ont pour principale fonction de présenter l'antigène et permettent de déclencher une réponse immunitaire efficace vis-à-vis d'une grande variété d'antigènes étrangers. Dans un contexte de greffe, cela se traduit par une très faible probabilité que donneur et accepteur aient une quelconque identité au niveau de ces antigènes d'histocompatibilité (Elliot & Eisen, 1988). Alors que les CMH-I sont présents à la surface de la quasi-totalité des cellules de l'organisme, les CMH-II ont une distribution plus étroite. Ils sont présents de façon constitutive uniquement à la surface des lymphocytes B et de certaines cellules phagocytaires, monocytes, macrophages et cellules dendritiques.

Des alloantigènes indépendants du système CMH peuvent également intervenir dans les mécanismes de reconnaissance du greffon. Ainsi, les antigènes mineurs d'histocompatibilité, nommés ainsi car ils sont insuffisants pour déclencher la réponse d'allorecognition, correspondent à des protéines exprimant une variabilité inter-individuelle suffisante pour susciter une réaction immunitaire chez l'hôte. Les antigènes de groupes sanguins ABO semblent également intervenir dans une moindre mesure, en raison de leur expression à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire.

B. Les mécanismes du rejet

Le rejet de greffe fait intervenir de nombreux partenaires cellulaires, mais l'intervention des lymphocytes, et plus particulièrement des cellules T, est prédominante dans la reconnaissance des alloantigènes et l'infiltration du greffon. La séquence des événements immunitaires conduisant au rejet peut schématiquement se diviser en deux phases : la phase de sensibilisation, au cours de laquelle les cellules T prolifèrent et se différencient en réponse à l'alloantigène, et la phase effectrice, au cours de laquelle va se produire la destruction du rejet.

1. La phase de sensibilisation

a. Nature des cellules sensibilisantes

Les cellules dendritiques étant présentes dans la majorité des organes et tissus utilisés comme transplants, elles représentent les meilleures cellules présentatrices capables de sensibiliser les lymphocytes du receveur et de déclencher la réaction d'allorecognition. En effet, des expériences de déplétion de ces cellules, soit à l'aide d'anticorps anti-CMH-II, soit en les laissant migrer hors du greffon avant transplantation, augmentent considérablement le temps de survie de la greffe. Bien que les lymphocytes B et les macrophages expriment aussi le CMH-II et peuvent ainsi déclencher une réponse T primaire, ils semblent peu impliqués dans cette étape de sensibilisation.

b. Activation du lymphocyte T

L'activation du lymphocyte T comprend au moins trois étapes. L'acquisition de compétence est la première étape et correspond à l'entrée de la cellule quiescente dans le

cycle cellulaire. La seconde étape est la prolifération lymphocytaire contrôlée par des facteurs de croissance, dont le plus important est l'IL-2, suivie par la troisième étape de différenciation fonctionnelle, caractérisée par une production diversifiée de lymphokines. Ces événements se traduisent par la transcription d'au moins cent gènes et se divisent en trois phases (Ullman *et al.*, 1990 ; Fraser *et al.*, 1993). La phase immédiate correspond à des événements intervenant en moins de trente minutes. Elle correspond entre autres à la mobilisation des facteurs de transcription *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, NF-AT et NF-κB. La phase précoce correspond aux événements nécessitant une synthèse protéique, mais survient avant la première division cellulaire. Elle est caractérisée par la synthèse de nombreuses cytokines, en particulier l'IL-2, et de la sous-unité α (CD25) du récepteur de l'IL-2. Cette sous-unité inductible va s'associer aux deux chaînes préexistantes β et γ, et former le récepteur de haute affinité pour l'interleukine-2 (Takeshita *et al.*, 1992). Enfin, la dernière phase, ou phase tardive, apparaît après la première division cellulaire, et est caractérisée par l'expression d'intégrines et de la molécule HLA-DR. L'affinité des molécules d'adhésion va augmenter, permettant de meilleures interactions cellulaires entre lymphocytes et endothélium. Les principales protéines induites lors de l'activation du lymphocyte T sont citées dans le tableau 5, p. 49

La sensibilisation demande une interaction physique entre la cellule dendritique et le lymphocyte T. Alors que la production de cytokines, comme l'IL-1, semble ne pas être indispensable, l'interaction entre le récepteur membranaire B7/BB1 de la cellule présentatrice et ses contre-récepteurs lymphocytaires CD28 et CTLA4 sont indispensables. Mais l'étape critique de l'activation est induite par la présentation de l'antigène au récepteur spécifique du lymphocyte T, le TCR/CD3, en association avec les marqueurs CD4 pour les lymphocytes T auxiliaires, et CD8 pour les lymphocytes T effecteurs.

Le TCR est un hétérodimère formé par l'association de deux chaînes α et β par l'intermédiaire de ponts disulfures. Ce dimère, associé au complexe CD3, reconnaît un complexe formé par l'antigène et les molécules du CMH exprimées à la surface des cellules présentatrices de l'hôte, ou directement les molécules du CMH des cellules dendritiques du greffon. Le CD3 est un complexe multimérique formé par l'assemblage de cinq sous-unités (γ, δ, ε, ζ, η). L'engagement du complexe TCR/CD3 provoque alors une cascade d'événements intracellulaires, les premiers correspondant à des phosphorylations sur des résidus tyrosine de différentes protéines telles que le CD5, la phospholipase Cγ1 (PLCγ1), et la chaîne ζ du complexe CD3. Trois tyrosine-kinases ont été caractérisées dans cette première étape de transduction du signal d'activation. Il s'agit de la p59^{lck} associée à la partie

cytoplasmique du TCR, de la p56^{lck} associée aux CD4 ou au CD8 et de la kinase Zap70 (Zeta Associated Protein), associée à la chaîne ζ du CD3 (Baldari *et al.*, 1993 ; Weiss, 1993).

L'activation de la PLC γ 1 conduit à la production de deux seconds messagers, les inositols phosphates et le diacylglycérol. Les inositol-phosphates provoquent un influx de calcium, nécessaire à l'activation d'enzymes Ca²⁺-calmoduline dépendantes, comme la PP2B ou calcineurine. Cette phosphatase va déphosphoryler le sous-unité cytosolique du facteur de transcription spécifique du lymphocyte T, le NF-AT, et permettre sa translocation dans le noyau. C'est à ce stade précoce de l'activation que la CsA et le FK506 exerceraient leurs propriétés immunosuppressives, en inhibant l'activité phosphatasique de la calcineurine. Le diacylglycérol active la protéine kinase C (PKC), qui, en phosphorylant entre autres l'inhibiteur cytoplasmique I-kB, va libérer le NF-kB et permettre sa translocation sous forme active dans le noyau. Un autre effet de la PKC est la phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Raf1, qui va à son tour activer la cascade des MAP-kinases (Mitogen Activated Protein kinases).

La voie CD28-B7/BB1 délivre un signal co-stimulant essentiel à l'acquisition de compétence du lymphocyte T (Schwartz, 1992). En l'absence de ce second signal, les lymphocytes entrent en état d'anergie, qui se traduit par une incapacité à produire de l'IL-2. Les cellules dendritiques expriment de manière constitutive la molécule B7 et sont donc potentiellement capables de délivrer les deux signaux d'activation aux cellules T de l'hôte (Hart *et al.*, 1993). Un autre ligand de la molécule B7 a également été décrit ; il s'agit du CTLA4, moins représenté que le CD28, mais d'affinité beaucoup plus importante (Linsley *et al.*, 1991). Cette voie permet entre autre l'activation du facteur nucléaire CD28RC (CD28 Responsive Complex) (June *et al.*, 1990).

Ces différents relais transductionnels vont aboutir à la transcription de gènes inductibles par l'intermédiaires de facteurs nucléaires, en agissant sur les régions promotrices de ces gènes. Ainsi, la région activatrice du gène de l'IL-2 contient 293 paires de bases et possèdent au moins neuf sites consensus de fixation pour des facteurs de transcription ubiquitaires ou spécifiques du lymphocyte T. Il s'agit en particulier de deux sites Oct-1, dont l'un serait la cible de la protéine inductible OAP, de deux sites pour le NF-AT, de deux sites AP-1, où se fixent les complexes dimériques de la famille *fos-jun*, d'au moins un site pour NF-kB et d'un site pour CD28RC (Emmel *et al.*, 1989 ; Brabletz *et al.*, 1991 ; Randak *et al.*, 1991 ; Fraser *et al.*, 1991). La transcription du gène de l'IL-2

nécessite l'interaction coopérative entre ces différents facteurs nucléaires, et donc la convergence de plusieurs voies de transduction.

Finalement, la production de l'IL-2 va permettre au lymphocyte d'entrer en phase de prolifération. Le signal mitogène se caractérise par la phosphorylation de la sous-unité ribosomale S6, ce qui va permettre d'augmenter l'activité traductionnelle accompagnant la division cellulaire. Plusieurs S6-kinases ont été décrites, et en particulier, la p90-S6-kinase, activable par les Map-kinases, et surtout la p70-S6-kinase, dont l'activation est inhibée par la rapamycine (Calvo *et al.*, 1991 ; Chung *et al.*, 1992 ; Price *et al.*, 1992).

Ces différentes étapes sont résumées dans la Fig. 8, p. 50.

TABLEAU 5 : Principaux facteurs induits après activation du lymphocyte T.

| Protéine | Temps d'apparition | Localisation |
|------------------------|--------------------|--------------|
| c-fos | 15 min | nucléaire |
| NF-AT | 20 min | nucléaire |
| c-myc | 30 min | nucléaire |
| NF- κ B | 30 min | nucléaire |
| INF- γ | 30 min | secrété |
| IL-2 | 45 min | secrétée |
| Récepteur IL-2 | 2 h | membranaire |
| IL-3 | 1-2 h | secrétée |
| IL-4 | > 6 h | secrétée |
| Récepteur transferrine | 14 h | membranaire |

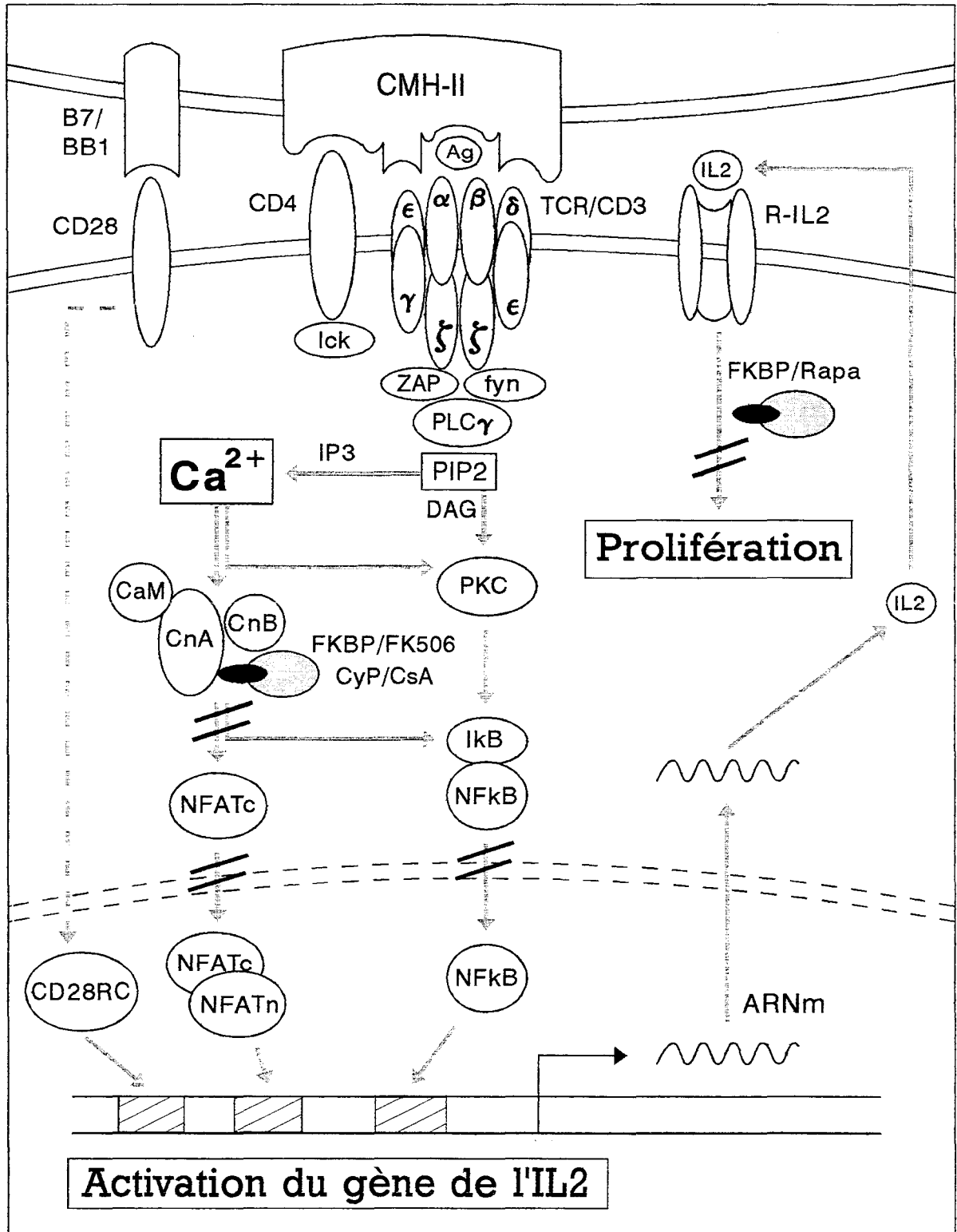


FIGURE 8 : Transduction des signaux d'activation du gène de l'IL-2 dans le lymphocyte T auxiliaire et localisation des sites d'action de la CsA , du FK506 et de la rapamycine.

c. Migration du lymphocyte sensibilisé

La sensibilisation du lymphocyte T peut s'effectuer soit dans les tissus lymphoïdes du receveur, ce qui nécessite la migration préalable des cellules dendritiques du greffon, soit directement dans le greffon dans le cas où ce dernier est vascularisé, facilitant ainsi la migration des cellules T de l'hôte *in situ*. Une autre alternative est le transport des cellules dendritiques par le sang jusqu'à la rate, où elles s'accumulent alors dans les zones riches en lymphocytes T (Larsen *et al.*, 1990). Dans tous les cas, les cellules T sensibilisées regagnent le greffon où elles vont infiltrer les tissus. Le processus d'infiltration nécessite des mécanismes spécifiques d'interaction entre lymphocytes T et cellules de l'endothélium, par l'intermédiaire de molécules d'adhésion. Dans un premier temps, des points de contacts vont se créer entre les deux types cellulaires, par l'intermédiaire de sélectines. Cette première interaction va générer un signal au lymphocyte qui va alors exprimer des intégrines à sa surface, conduisant à la création d'une puissante force d'adhésion avec la cellule endothéliale. Finalement, le lymphocyte T va pouvoir infiltrer le tissu en passant par les jonctions intercellulaires de l'endothélium (Dallman *et al.*, 1987).

2. La phase effectrice.

Des mécanismes immunitaires, à médiation cellulaire et humorale, et inflammatoires vont aboutir à la destruction du greffon. Les différentes cellules effectrices sont principalement des lymphocytes T et des monocytes/macrophages. Des anticorps spécifiques des antigènes du greffon peuvent également intervenir dans le processus de rejet, par activation soit du complément, soit des lymphocytes à cytotoxicité anticorps-dépendante.

a. Les lymphocytes cytotoxiques

Les lymphocytes cytotoxiques alloréactifs apparaissent très tôt dans les ganglions périphériques au moment du rejet, bien avant que ne soient détectables des anticorps contre les antigènes du greffon. L'activation des lymphocytes cytotoxiques, de phénotype CD8+, implique au moins deux signaux. La reconnaissance directe des antigènes du CMH-I du greffon, ou des antigènes mineurs dégradés et présentés associés aux molécules de CMH-I de l'hôte, correspond au premier signal. Très rapidement, la transcription de nombreux gènes est activée, en particulier celle de la sous-unité inductible du récepteur de l'IL-2. Les

lymphocytes cytotoxiques vont alors pouvoir proliférer en réponse au second signal, généré par la fixation de l'IL-2 à son récepteur. Cette cytokine étant produite essentiellement par les lymphocytes T auxiliaires activés, il apparaît que la phase de sensibilisation associée à la reconnaissance des molécules de CMH-II des cellules présentatrices du greffon, est l'étape clé du phénomène du rejet. En réponse à ces deux signaux, les lymphocytes cytotoxiques activés vont se différencier soit en cellules effectrices et détruire les cellules cibles, soit en cellules mémoires (Tyler *et al.*, 1984).

b. Les cellules de l'hypersensibilité retardée

Les mécanismes de l'hypersensibilité retardée font intervenir des lymphocytes T, des monocytes/macrophages et des polymorphonucléaires neutrophiles et basophiles. En réponse aux nombreuses cytokines sécrétées par les cellules T auxiliaires, les mastocytes vont libérer de la sérotonine, qui va altérer l'intégrité de l'endothélium et faciliter la migration des cellules effectrices. Entre autres, les monocytes du sang vont se différencier au niveau du site de l'inflammation et produire à leur tour des cytokines, mais surtout des radicaux oxygénés et des enzymes protéolytiques qui vont provoquer de graves lésions au greffon.

c. Les anticorps

Des anticorps spécifiques du greffon sont souvent retrouvés dans le plasma de l'hôte après un rejet de greffe. Ces anticorps sont associés soit à l'activation du complément, soit à une cytotoxicité à médiation lymphocytaire. S'ils semblent ne jouer qu'un rôle secondaire au cours d'un rejet aigu, par contre, ils sont importants pour comprendre les processus de rejet chronique. En effet, ce type de rejet n'apparaît le plus souvent que plusieurs mois après la transplantation, malgré une immunosuppression efficace, et ne fait pas intervenir les habituelles cellules cytotoxiques. Des mécanismes plus généraux de réaction inflammatoire semblent expliquer ce phénomène, notamment en réponse à la sécrétion de cytokines par les cellules endothéliales du greffon.

Les mécanismes cellulaires de reconnaissance allogénique sont décrits dans la Fig. 9, p. 53.

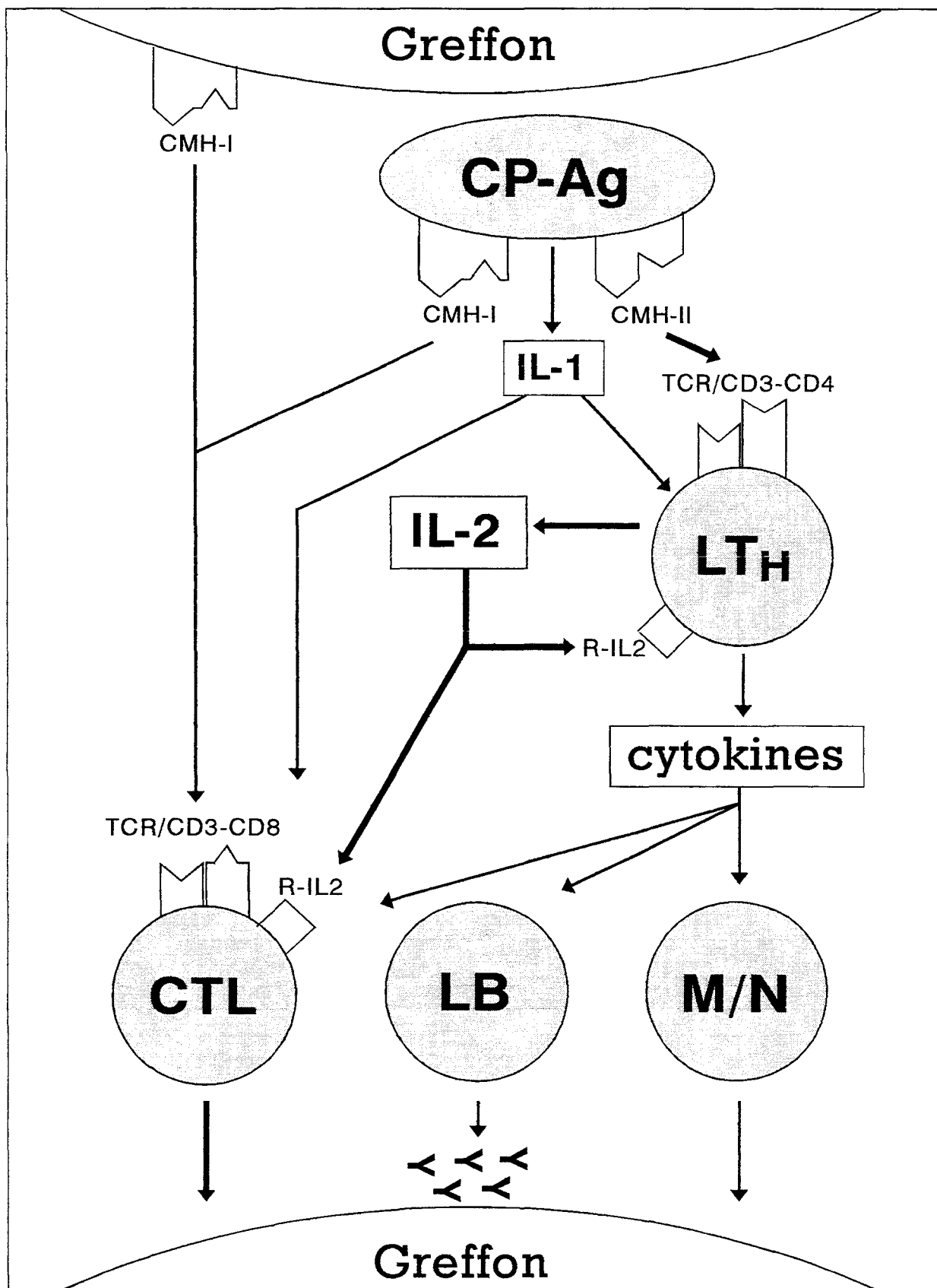


FIGURE 9 : Représentation générale des mécanismes cellulaires de l'alloreconnaissance.

LT_H : lymphocyte T auxiliaire ; CTL : lymphocyte cytotoxique

LB : lymphocyte B ; M/N : monocyte/neutrophile

II. Prévention du rejet de greffe

A. Le traitement immunosuppresseur

1. Les immunosuppresseurs

Des recherches considérables ont été réalisées pour comprendre et prévenir les phénomènes immunitaires de rejet de greffe.

La liste des médicaments à activité immunosuppressive utilisés en transplantation clinique s'est largement développée au cours de ces dernières années. L'utilisation de nouveaux immunosuppresseurs, associée à une meilleure sélection du donneur, a permis une nette amélioration du temps de survie des greffes, notamment en matière de transplantation de coeur et de foie. Les immunosuppresseurs non spécifiques, tels que les corticostéroïdes, l'azathioprine et les séra polyclonaux anti-lymphocytaires sont aujourd'hui couramment associés à des médicaments plus sélectifs, tels que la CsA et certains anticorps monoclonaux. De nombreux autres immunosuppresseurs sont en cours d'expérimentation clinique. Ce sont le FK506, qui agit comme la CsA en inhibant l'activation Ca^{2+} -dépendante du lymphocyte, la rapamycine, qui inhibe la phase de prolifération induite par l'IL-2, ainsi que des molécules de découverte plus récente, comme l'acide mycophénolique et la 15-désoxyspergualine (Schreiber, 1991).

Les médicaments sélectifs permettent une immunosuppression efficace en ciblant soit certaines populations cellulaires avec les anticorps monoclonaux, soit certaines voies métaboliques de l'activation lymphocytaire avec la CsA, le FK506 et la rapamycine.

Cependant, les immunosuppresseurs posent encore de nombreux problèmes. En effet, certains phénomènes de rejet sont encore mal contrôlés, et ces médicaments ont d'importants effets secondaires : toxicité médullaire de l'azathioprine, néphrotoxicité et hépatotoxicité de la CsA, maladies sériques liées aux séra anti-lymphocytaires.

2. Activités de la cyclosporine

En raison de son importante lipophilie, la CsA diffuse dans toutes les cellules de l'organisme, où elle va interférer dans de nombreux processus métaboliques. Cependant, aux doses habituellement utilisées en thérapie, elle va surtout intervenir au niveau des

cellules de l'immunité, et presque sélectivement dans les mécanismes de réponse immunitaire à médiation cellulaire.

La cible prioritaire de l'action de la CsA est le lymphocyte T auxiliaire, ce qui fait de cette molécule un remarquable médicament dans les traitements visant à supprimer la réponse précoce du système immunitaire. Dans ces cellules, elle va bloquer les voies de transduction Ca^{2+} -dépendantes et inhiber la transcription des gènes de nombreuses cytokines, telles que IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α (Sigal & Dumont, 1992) et des chaînes α et β du récepteur de l'IL-2 (Li *et al.*, 1992). Ainsi, au niveau du gène de l'IL-2, elle bloque l'induction de la transcription en inhibant l'activation de facteurs de transcription, tels que NF-AT, NF-IL2 et NF-kB, et leur fixation sur la région promotrice du gène inductible (Randak *et al.*, 1990 ; Mattila *et al.*, 1990). C'est essentiellement en inhibant l'expression de cette cytokine et l'apparition de son récepteur de haute affinité que la CsA va prévenir l'activation et la prolifération des lymphocytes T, en bloquant la boucle autocrine de l'IL-2.

La CsA agit également sur les lymphocytes T cytotoxiques en inhibant la prolifération IL-2-dépendante et les mécanismes Ca^{2+} -dépendants de l'exocytose de leurs granules (Ferrini *et al.*, 1986 ; Trenn *et al.*, 1989 ; Dutz *et al.*, 1993). Par contre, elle n'a pas d'effet sur l'activité des lymphocytes T suppresseurs (Bucy, 1988).

Enfin, elle inhibe l'induction TCR-dépendante de la mort cellulaire programmée, ou apoptose, des thymocytes et de cellules T d'hybridomes *in vitro*, ainsi que la sélection des thymocytes *in vivo* (Shi *et al.*, 1989 ; Fruman *et al.*, 1992b).

Chez les lymphocytes B, la CsA bloque la transcription du gène du TNF- α induite par le phospholipide PAF (platelet-activating factor) ou par des anticorps anti-immunoglobuline de surface. Par contre, elle n'a aucun effet sur les voies d'activation induites par les esters de phorbol, suggérant que comme pour les lymphocytes T, les lymphocytes B ont au moins deux voies de transduction des signaux d'activation, dont une est sensible à la CsA (Smith *et al.*, 1994). Elle augmente également la production des IgM et IgG chez les cellules B préactivées par la toxine de *Staphylococcus aureus* ou par l'IL-2 (Kim *et al.*, 1994).

La CsA agit directement sur certains mécanismes inflammatoires. Ainsi, elle inhibe de nombreux mécanismes de dégranulation, comme la sécrétion de l'histamine et du leukotriène C4 (LT4) par les basophiles et les mastocytes, et de la lactoferrine par les neutrophiles (Cirillo *et al.*, 1990 ; Amon, 1992).

La CsA et certains de ses dérivés sont même proposés dans les traitements contre le virus HIV. En effet, l'association d'une immunotoxine et de la CsA permet de lutter efficacement *in vitro* contre la production de virions. Un complexe anticorps anti-CD25/ricine A se fixe sur les lymphocytes T activés, ciblant la toxine sur ces cellules et empêchant les particules virales de se former. En complément, la CsA inhibe l'activation des lymphocytes quiescents, ce qui empêche la prolifération du virus (Bell *et al.*, 1993). Le dérivé [MeIle-4]-cyclosporine n'a pas d'activité immunosuppressive, mais se fixe aux cyclophilines avec la même affinité que la CsA. Par contre, ce composé est un puissant inhibiteur de la croissance du HIV de type I en bloquant sélectivement la formation des particules virales. Etant donné qu'il est moins toxique pour le rein que la CsA, ce dérivé sera peut-être un nouveau médicament dans les thérapies anti-HIV (Rosenwirth *et al.*, 1994; Thall *et al.*, 1994).

B. Mécanismes moléculaires de l'action de la CsA

1. Une cible commune pour les complexes immunosuppresseurs

La CsA et le FK506 inhibent des voies de transduction dépendantes du Ca^{2+} . Dans le lymphocyte T, ces deux molécules bloquent la transcription de nombreux gènes inductibles, la dégranulation des cytotoxiques et l'induction de l'apoptose, en se complexant à leurs immunophilines respectives. Etant donné que ces protéines sont des PPIases, il a d'abord été suggéré que l'activité des immunosuppresseurs était liée à l'inhibition de l'activité enzymatique des cyclophilines et FKBP(s). Cependant, de nombreux travaux suggéraient un mécanisme plus complexe (Bierer *et al.*, 1990b ; Schreiber, 1991 ; Cyert *et al.*, 1991 ; Sigal *et al.*, 1991 ; Dumont *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1992 ; Nelson *et al.*, 1993 ; Bierer *et al.*, 1993).

- les doses thérapeutiques de CsA utilisées pour prévenir le rejet de greffe sont nettement insuffisantes pour saturer tous les sites potentiels de fixation et bloquer totalement l'activité enzymatique des cyclophilines. En effet, la concentration de CsA nécessaire pour inhiber la transcription du gène de l'IL-2 ne correspond qu'à 1% de cyclophiline complexée, ce qui suppose qu'il y a bien formation d'un complexe CyP/CsA, mais pas inhibition totale de l'activité rotamase associée à cette famille de protéines.

- la CsA et le FK506 inhibent respectivement les activités PPIases des cyclophilines et des FKBP(s), et tous deux bloquent l'activation du lymphocyte T. Or, si les cellules sont incubées avec la CsA, -ou avec le FK506-, l'activité PPIase des FKBP(s), -ou des cyclophilines-, est encore active dans la cellule, et pourtant il y a bien immunosuppression. Cette remarque suggère que l'activité rotamase globale des immunophilines n'est pas directement liée à l'immunosuppression, car un seul médicament est suffisant.

- les spectres d'action de la rapamycine et du FK506 sont différents, bien qu'il se fixent à la même immunophiline. En effet, si le FK506 inhibe les mécanismes Ca^{2+} -dépendants d'activation, d'apoptose et de dégranulation des lymphocytes T, la rapamycine inhibe la prolifération induite par L'IL-2. Pourtant, ces deux macrolides entrent en compétition pour la fixation sur les mêmes immunophilines et inhibent leur activité enzymatique, suggérant qu'ils ont deux cibles d'actions différentes et que les FKBP(s) ne sont que des transporteurs intermédiaires.

- il a été suggéré que l'activité PPIase des immunophilines pouvait intervenir dans la mise en conformation de protéines indispensables à l'activation lymphocytaire. Cependant, aucune protéine mal conformée n'a été mise en évidence dans les cellules traitées à la CsA aux doses thérapeutiques.

- CsA et FK506 sont toxiques pour *S. cerevisiae*. Pourtant, les levures présentant des délétions au niveau des gènes d'immunophilines sont encore viables et continuent à croître dans des conditions normales. Il semble donc que les activités PPIases ne sont pas indispensables à la survie des eucaryotes inférieures, et que l'effet létal des immunosuppresseurs sur les levures n'est pas uniquement dû à l'inhibition de l'activité rotamase.

- les analogues structuraux non immunosuppresseurs de la CsA et du FK506, le 506BD et la [MeAla⁶]-CsA se fixent respectivement aux FKBP(s) et aux cyclophilines, mais les complexes ne se fixent pas à la calcineurine. De plus, ces composés entrent en compétition *in vivo* avec les vrais immunosuppresseurs et suppriment leurs effets inhibiteurs, ce qui montrent bien que la première étape de l'immunosuppression est la fixation sur les immunophilines.

Il a été alors proposé que les immunosuppresseurs modulaient l'activité de molécules cruciales pour la transduction des signaux dans la cellule, et que les immunophilines avaient pour fonction de porter ces médicaments pour leur permettre d'exercer leur activité. Etant donné que la CsA et le FK506 avaient la même activité, il a été suggéré qu'ils avaient une cible commune impliquée dans les voies de transduction des

signaux de l'exocytose et la transcription de gènes inductibles (Schreiber, 1991 ; Hultsch *et al.*, 1991). La découverte que ces complexes fixaient la calcineurine conforta cette hypothèse (Liu *et al.*, 1991).

2. La calcineurine au centre de l'immunosuppression

In vitro, les complexes CyPA/CsA, CyPB/CsA, CyPC/CsA et FKBP12/FK506 se fixent à la calcineurine et inhibent son activité enzymatique, mais pas FKBP13/FK506 et FKBP25/FK506 (Liu *et al.*, 1991 ; Swanson *et al.*, 1992). Par contre, aucun des complexes FKBP(s)/rapamycine ne se fixent à cette phosphatase, ce qui explique que les spectres d'action de la CsA et du FK506 sont semblables, alors que celui de la rapamycine est différent. Une preuve directe de l'intervention de la calcineurine est apportée par le dérivé MeBm₂t-CsA. En effet, ce composé se fixe mal aux cyclophilines, mais son activité immunosuppressive est semblable à celle de la CsA. Par contre, les complexes CyP(s)/MeBm₂t-CsA ont une forte affinité *in vitro* pour la calcineurine, ce qui suggère que l'interaction des complexes CyP(s)/CsA avec la calcineurine est primordiale pour l'immunosuppression (Liu *et al.*, 1992).

L'activité enzymatique des autres sérine/thréonine phosphatases PP1, PP2A et PP2C n'est pas inhibée par les complexes immunosuppresseurs, ce qui suggère que la calcineurine est bien la cible centrale de l'immunosuppression, et que cette phosphatase représente l'enzyme clé des voies de transduction des signaux Ca²⁺-dépendants dans le lymphocyte. En effet, l'inhibition de la calcineurine par les complexes CyP(s)/CsA est étroitement corrélée avec l'inhibition de la synthèse de l'IL-2. Par contre, ni la CsA, ni les complexes n'ont d'effet sur le flux de Ca²⁺, le cycle des inositols phosphates et l'activation de la PKC. Enfin, les cellules Jurkat surexprimant la calcineurine sont moins sensibles à la CsA et au FK506, démontrant que cette enzyme est un intermédiaire indispensable des voies de transcription Ca²⁺-dépendantes (O'Keefe *et al.*, 1992 ; Clipstone & Crabtree, 1992).

Mais la calcineurine est également impliquée dans la plupart des mécanismes Ca²⁺-dépendants du lymphocyte. En effet, l'induction de l'apoptose dans les thymocytes et certains hybridomes T, du processus de sélection thymique et de dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques est étroitement corrélée à son activité, suggérant que l'inhibition de ces mécanismes par la CsA est due à l'inhibition de cette phosphatase (Fruman *et al.*, 1992b ; Dutz *et al.*, 1993 ; Bierer *et al.*, 1993).

Les cyclophilines et FKBP(s) sont représentées par différentes isoformes dans les compartiments subcellulaires. Des études ont donc été entreprises afin de connaître quelles isoformes étaient impliquées dans la médiation *in vivo* de l'activité des immunosuppresseurs. Ainsi, l'utilisation de bifonctionnels et du dérivé PL-CS montrent que la CyPA est majoritairement associée à la calcineurine et à la CsA dans le lymphocyte T (Ryffel *et al.*, 1993). La surexpression des CyPA et CyPB augmente les effets de la CsA. Si ces résultats sont compréhensibles pour la CyPA, qui est cytosolique tout comme la calcineurine, l'implication de la CyPB est plus surprenante étant donné sa compartimentation. En effet, la CyPB peut difficilement interagir physiquement avec la calcineurine. Les auteurs ont donc supposé qu'il existait une fraction cytosolique de CyPB, soit naturelle, soit provoquée par la surexpression de cette protéine, ou que cette cyclophiline agissait sur l'activité de la calcineurine par une voie indirecte. Par contre, la surexpression de la CyPC n'a aucun effet sur la calcineurine, suggérant que la localisation de cette isoforme l'empêche d'interagir avec la calcineurine. Cependant, la construction d'une protéine chimère de la CyPC contenant les extrémités spécifiques de la CyPB restaure une activité immunosuppressive en présence de CsA. Ces travaux suggèrent que les séquences non homologues de la CyPB dirigent cette isoforme dans des compartiments particuliers, différents de ceux de la CyPC, et où elle peut agir sur l'activité de la calcineurine. Quant aux FKBP(s), leur surexpression confirme les travaux précédents *in vitro* puisque seul la FKBP12 est active, contrairement aux FKBP13 et FKBP25 (Bram *et al.*, 1993).

3. Les substrats de la calcineurine

La calcineurine possède une activité phosphatase Ca^{2+} -dépendante, et l'activité inhibitrice des immunosuppresseurs est sans doute directement reliée à des défauts de déphosphorylation des substrats potentiels de cette enzyme.

Un de ses substrats caractéristiques est la sous-unité cytosolique du facteur de transcription NF-AT spécifique des lymphocytes T, nommée NF-ATc (Jain *et al.*, 1993). Le NF-ATc est une protéine de masse moléculaire apparente de 110-140 kDa dans le lymphocyte quiescent, et de 90-120 kDa dans le lymphocyte activé, la perte de masse étant due à déphosphorylation *in vivo* (McCaffrey *et al.*, 1993a). Ce facteur joue un rôle clé dans l'expression de l'IL-2, en se fixant sur la région promotrice du gène de cette cytokine. En effet, le NF-ATc déphosphorylé s'associe entre autres aux protéines nucléaires c-fos et c-jun, pour former un complexe actif (Jain *et al.*, 1992 ; McCaffrey *et al.*, 1993b ; Jain *et al.*,

1993). Cette interaction nécessite sa translocation du cytosol vers le noyau. C'est en inhibant l'étape cruciale de déphosphorylation que la CsA et le FK506 inhibent les processus permettant la translocation du NF-ATc dans le noyau et inhibe son activité transcriptionnelle (Flanagan *et al.*, 1991 ; Liu *et al.*, 1992). Les facteurs de transcription Oct-1 et NF-kB sont également sensibles à la CsA et au FK506, et représentent des cibles potentielles de la calcineurine (Randak *et al.*, 1990 ; Mattila *et al.*, 1990). Cependant, l'activation du NF-kB nécessite un second signal non sensible à la CsA. En effet, ce facteur de transcription est normalement présent dans le cytosol sous une forme inactive associée à une sous-unité inhibitrice, le I-kB. La translocation du NF-kB nécessite l'inactivation du I-kB, mécanisme qui peut être induit par les esters de phorbols (Frantz *et al.*, 1994).

Dans les lymphocytes T, l'inhibition de la dégranulation et de l'apoptose est corrélée à l'inactivation de la calcineurine (Fruman *et al.*, 1992b). De même, dans les lymphocytes B, la CsA protège de l'apoptose provoquée par des anticorps anti-immunoglobulines de surface ou par des ionophores, en inhibant l'activité de la calcineurine. Par contre, l'acide okadaïque qui inhibe l'activité des PP1, 2A et 2C, n'a aucun effet. Ces résultats suggèrent que la calcineurine contrôle les mécanismes d'apoptose dans les cellules B et T, mais que son substrat reste à déterminer (Bonney-Berard *et al.*, 1994).

Dans les cellules acineuses, la CsA inhibe la calcineurine et bloque la déphosphorylation d'une protéine de 24 kD impliquée dans la sécrétion d'amylase après activation par la cholecystokinine (Grolewski *et al.*, 1994).

Enfin, les cyclophilines des plantes et des eucaryotes inférieures se fixent en présence de CsA à des formes de calcineurine. Ainsi, chez les plantes supérieures, la CsA bloque l'ouverture des canaux K^+ dont l'activité est régulée par une phosphatase Ca^{2+} -dépendante équivalente à la calcineurine des mammifères (Luan *et al.*, 1993).

III. Hétérogénéité de la réponse à la CsA

A. Problèmes liés à l'utilisation clinique de la CsA

Bien que la CsA soit aujourd'hui largement utilisée, de nombreux problèmes de sensibilité et de toxicité sont encore associés à ce médicament. En effet, la survie d'une greffe dépend largement de l'individu transplanté, en raison de l'importance des différences d'histocompatibilité, de son niveau d'immunocompétence et des variations individuelles de susceptibilité au traitement immunosuppresseur.

De nombreuses études ont montré que des individus greffés ayant un degré d'histocompatibilité semblable ne répondent pas de façon identique pour un même taux de CsA. Cette hétérogénéité de sensibilité peut intervenir à plusieurs niveaux. Elle peut être due à des différences de disponibilité et de métabolisme du médicament, à une susceptibilité différente de la cellule cible, en l'occurrence le lymphocyte T, et fait souvent encourir des risques de toxicité (Lindholm, 1991).

1. Variations de sensibilité lymphocytaire

Les lymphocytes T sont très hétérogènes chez un même individu, tant au niveau de leur degré de maturation que de leur activité. Si les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques sont sensibles à l'effet immunosuppresseur de la CsA, les lymphocytes T suppresseurs sont eux peu sensibles (Bucy *et al.*, 1988). De plus, les lymphocytes naïfs, par opposition aux lymphocytes dits éduqués, n'ont pas diversifié leur production d'interleukines et ne sécrètent pratiquement que l'IL-2 en réponse au signal d'activation. La prolifération de ces lymphocytes naïfs est presque exclusivement dépendante de la présence de l'IL-2 comme facteur de croissance, suggérant que leur grande sensibilité à l'effet de la CsA est due à la forte inhibition de la synthèse de cette cytokine (Byrne *et al.*, 1988). Le phénotype de réponse à la CsA pourrait ainsi être relié à l'abondance de ces différentes sous-populations chez un même individu (Akbar *et al.*, 1991).

La réponse lymphocytaire à la CsA peut être mesurée *in vitro* par l'estimation de l'inhibition de l'activation lymphocytaire induite par un alloantigène ou un anticorps anti-

CD3. Elle peut être estimée par la dose inhibitrice 50 (DI₅₀), dose moyenne nécessaire pour inhiber 50% de la prolifération des lymphocytes, par l'expression de l'IL2 et par l'apparition de marqueurs membranaires, tels que le CD25.

Ces techniques ont permis de mettre en évidence d'importantes variations individuelles de sensibilité à la CsA *in vitro*. Une grande variabilité d'incorporation du médicament dans les lymphocytes a également été observée, mais n'a pu être directement corrélée avec son activité immunosuppressive (Sander *et al.*, 1986 ; Povlsen *et al.*, 1990). Récemment, l'étude sur une large population de sujets sains a montré l'existence de trois populations d'individus, classés arbitrairement en fonction de leur DI₅₀. 60% sont considérés comme "bons répondeurs" avec une DI₅₀ inférieure à 200 ng/ml de CsA, 20% comme "répondeurs intermédiaires" avec 200 < DI₅₀ < 400 ng/ml, et le reste comme "résistants" avec une DI₅₀ supérieure à 400 ng/ml (Masy *et al.*, 1994).

2. Toxicité de la CsA

Les principaux effets indésirables observés dans les thérapies à base de CsA sont une importante néphrotoxicité, une hypertension artérielle, une dysfonction hépatique, une neurotoxicité, des troubles digestifs et une hypertrophie gingivale. Plus rarement sont observés des problèmes d'infection liés à l'immunosuppression et des tumeurs malignes, telles que leucémies, lymphomes B, carcinomes du poumon et des voies urinaires.

La CsA provoque une insuffisance rénale souvent liée à une fibrose intersticielle. Une atteinte des artéoles préglomérulaires est également décrite, avec une augmentation locale de la pression artérielle. Ces effets sont dépendants de la concentration en médicament et le plus souvent lié à un surdosage, ce qui définit une faible marge thérapeutique entre l'effet bénéfique immunosuppresseur et l'effet toxique. La CsA induit une diminution de synthèse de la matrice conjonctive dans la gencive et le rein, favorisant la prolifération des fibroblastes et l'apparition d'une hyperplasie fibreuse (Willershausen-Zönnchen *et al.*, 1992). De plus, dans les cellules de rein, la CsA provoque des modifications de phosphorylation des protéines membranaires et cytosoliques et une augmentation des activités PKC et tyrosine-kinase dans les membranes baso-latérales. Par contre, elle n'altère pas l'activité de la calcineurine, suggérant que la toxicité rénale passe par des mécanismes différents de ceux impliqués dans l'immunosuppression (Demeule *et al.*, 1994).

B. Facteurs influençant l'activité de la CsA

1. Distribution et pharmacocinétique de la CsA

La CsA est habituellement administrée par voie orale, à raison de 6 à 15 mg/kg/jour, en association avec de l'huile de ricin polyoxyéthylénée, le Crémophor (Sandimmun). Son absorption se fait par l'intestin grêle et nécessite la présence de sels biliaires. Elle est donc modifiée dans le cas d'une mauvaise fonction hépatique. Après une prise orale, la CsA est directement active et se distribue largement au niveau des tissus extravasculaires (foie, rein, glandes endocrines, tissu adipeux). Sa concentration dans le sang est maximale entre une et six heures (Borel, 1989). La CsA circulante est majoritairement associée aux hématies (60%) et aux protéines plasmatiques (30%) : 85 à 90% de la CsA plasmatique est liée aux lipoprotéines, en particulier aux HDL, et 5 à 15% aux autres protéines circulantes, presque exclusivement avec la sérumalbumine. Seule une très faible fraction, environ 0,5%, est retrouvée libre dans le plasma, et à peine 10% est associé aux leucocytes. Il faut noter que la fraction associée aux lymphocytes, environ 5%, représente la fraction effectivement active pour inhiber les mécanismes de la réponse immunitaire (Lindholm, 1992).

Des expériences d'incorporation de CsA tritiée dans les cellules mononucléées du sang ont permis de mettre en évidence deux catégories de récepteurs, le premier étant saturable, cytosolique et spécifique et le second non saturable et non spécifique. La fixation spécifique a un Kd de 100 nM et un nombre de sites d'environ 10^7 /cellule (Ryffel *et al.*, 1982 ; Merker & Handschumacher, 1984). La protéine fixant la CsA dans les cellules du sang *in vivo* a été identifiée comme étant principalement la CyPA (Foxwell *et al.*, 1988 ; Foxwell *et al.*, 1992).

La CsA est essentiellement métabolisée au niveau du foie par des cytochromes P450. A ce niveau, l'hydroxylation et la déméthylation du médicament fournit de nombreux métabolites secondaires, la plupart étant dépourvus de propriétés immunosuppressives (Kronbach *et al.*, 1988). Ces métabolites sont essentiellement éliminés par voie biliaire. Cette métabolisation hépatique explique les nombreuses interactions médicamenteuses, notamment avec les xénobiotiques qui agissent sur le système d'oxydation microsomal du foie, ce qui modifierait le taux circulant de CsA active.

La faible marge thérapeutique de la CsA, sa grande variabilité pharmacocinétique inter- et intra-individuelle, ainsi que le risque des nombreuses interactions médicamenteuses, rendent nécessaire un suivi thérapeutique précis des patients traités avec cet

immunosuppresseur. Les mesures reflètent directement l'activité du médicament, puisqu'il existe un parallélisme entre les taux actifs *in vitro* et l'activité *in vivo* de la CsA. La fourchette thérapeutique, en considérant le taux résiduel sanguin, est comprise entre 50 et 300 ng/ml. Ce taux peut varier en fonction de la nature de la greffe et de son ancienneté, mais globalement, des doses inférieures font encourir un risque de rejet, alors que des taux supérieurs font craindre des manifestations de toxicité (Lindholm, 1991).

2. Modulations des mécanismes d'action de la CsA

a. Variations des voies de transduction des signaux d'activation

α. les voies sensibles à la CsA

La surexpression de la calcineurine augmente la résistance des cellules à la CsA, suggérant que le taux faible de cette enzyme dans les cellules T puisse être en partie responsable de l'action sélective de la CsA (O'Keefe *et al.*, 1992 ; Clipstone & Crabtree, 1992). Cependant, de nombreux types cellulaires expriment des taux semblables de calcineurine, sans pour autant être aussi sensibles que les lymphocytes T. De plus, l'activité enzymatique de la calcineurine n'est pas directement liée à l'abondance de la protéine. En effet, l'activité phosphatase est nettement plus élevée dans la rate et le thymus que dans le cerveau et le foie, organes dans lesquels elle est pourtant très abondante (Katagiri *et al.*, 1993).

La sous-unité NF-ATc ne serait exprimée que dans les cellules lymphoïdes, ce qui pourrait expliquer la sélectivité d'action de la CsA et du FK506 dans ces cellules (McCaffrey *et al.*, 1993b). Cependant, la calcineurine a une répartition ubiquitaire dans toutes les cellules, et il semble évident que cette enzyme possède d'autres substrats. Leur déphosphorylation et, par conséquent leur activités pourraient être potentiellement inhibées par ces deux immunosuppresseurs.

Le récepteur CAML de la CyPB interviendrait dans la régulation du flux calcique (Bram *et al.*, 1994). En bloquant les interactions entre ces deux protéines, la CsA pourrait perturber la disponibilité du Ca^{2+} pour les voies de transduction Ca^{2+} -dépendantes, et en particulier celles impliquant la calcineurine. Cependant, CAML, CyPB et calcineurine sont présentes dans tous les tissus testés, particulièrement dans le système nerveux, et il est peu probable que l'inhibition de l'activité du couple CAML/CyPB soit directement liée à l'action sélective de la CsA.

D'autres voies de transduction sont également sensibles à la CsA et peuvent s'ajouter à celle de la calcineurine. La voie de transduction impliquant la PKC- α est connue pour être insensible à la CsA. Par contre, la voie impliquant la PKC- β , voie faisant intervenir une lysophosphatide acyl transférase, et conduisant à la formation d'acides gras polyinsaturés comme second messagers, est sensible à la CsA et complètement inhibée par 200 ng/ml d'immunosuppresseur. Or, cette voie est également impliquée dans la transcription du gène de l'IL-2, ce qui en fait une voie parallèle à celle de la calcineurine (Szamel *et al.*, 1993). D'ailleurs, l'inhibition de ces voies de transduction minoritaires peuvent être à l'origine de certains effets toxiques du médicament. En effet, la CsA provoque des développements anormaux chez les embryons de souris en inhibant les mécanismes induits par l'acide arachidonique (Uhing *et al.*, 1993).

β . les voies résistantes à la CsA

De nombreuses voies de transduction ne sont pas sensibles à la CsA. Ainsi, la PKC- α et les sérine/thréonine phosphatases autres que la calcineurine sont pas affectées par la CsA *in vivo*, ni par les complexes CyP(s)/CsA *in vitro* (Fruman *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1992).

De même, le signal induit par l'engagement du CD28 n'est pas bloquée par la CsA. Le facteur de transcription CD28RC n'apparaît que lors d'une co-stimulation CD3/CD28. Il augmente la réponse proliférative des lymphocytes *in vitro* et la résistance des cellules à l'action de la CsA (Frasen *et al.*, 1991). De même, l'inhibition de la voie CD28/B7 n'est pas suffisante pour inhiber la prolifération des lymphocytes activés *in vitro*, mais augmente fortement leur sensibilité à la CsA (Van Gool *et al.*, 1994). Cependant, des études récentes suggèrent qu'il n'y a pourtant pas de relation directe entre l'engagement de la voie CD28/BB7 et les variations inter-individuelles de réponse à la CsA (Masy *et al.*, 1994).

b. Importance des récepteurs de la CsA

De nombreuses protéines ont été décrites comme étant des récepteurs de la CsA. Par leur répartition différente dans les cellules et l'importance de leurs fonctions biologiques, elles peuvent influencer la distribution et l'activité du médicament, tout comme intervenir dans les phénomènes de sensibilité inter-individuelles.

L'utilisation du dérivé PL-CS photoactivable a permis de mettre en évidence de nombreux récepteurs de la CsA *in vivo*. Dans les cellules Jurkat, les protéines identifiées ont des masses moléculaires apparentes de 20, 40, 46 et 60 kDa, la première correspondant à la

CyPA (Foxwell *et al.*, 1992 ; Ryffel *et al.*, 1992). De nombreuses protéines sont retenues sur une colonne de CsA immobilisée et représentent autant de récepteurs potentiels. Le fractionnement cellulaire permet de montrer que la majorité de la CsA est localisée dans le cytosol et associée à la CyPA, mais le médicament est également retrouvé dans tous les autres compartiments subcellulaires (Thalhammer *et al.*, 1992).

α. les récepteurs intracellulaires

La CsA interagit avec de nombreuses protéines intracellulaires, mais la plupart de ces récepteurs ne sont pas spécifiques, en ce sens qu'ils ne discriminent pas la CsA et ses dérivés non immunosuppresseurs. Par contre, ces interactions peuvent jouer un rôle important dans la toxicité du médicament, par l'inhibition des activités biologiques de ces protéines.

Une des premiers récepteurs cellulaires de la CsA à avoir été décrit est la calmoduline (Colombani *et al.*, 1985). Cependant, de nombreux travaux suggèrent que cette fixation est peu spécifique et n'intervient pas dans les mécanismes de l'immunosuppression. En effet, les analogues non immunosuppresseurs se fixent à la calmoduline avec des affinités semblables à celle de la CsA, et d'autre part, les quantités d'immunosuppresseurs nécessaires pour bloquer son activité sont très supérieures à celles utilisées en immunosuppression (Legrue *et al.*, 1986 ; Foxwell *et al.*, 1989a).

Parmi les nombreuses autres protéines interagissant avec la CsA, nous pouvons citer l'actine et la HSP-70. Ces deux protéines possèdent un domaine présentant de fortes homologues de séquence et correspondant sans doute à un site commun de fixation de l'immunosuppresseur (Moss *et al.*, 1992). Bien que peu affines, ces récepteurs sont spécifiques de la CsA et de ses dérivés. Cependant, des protéines de 50-58 kDa et 100 kDa fixent aussi bien la CsA que le FK506 et la rapamycine avec une forte affinité. Ces protéines sont présentes en très faibles quantités dans les cellules T, les thymocytes, mais sont absentes des cellules du foie et du rein (Soldin S.J., 1992). La protéine de 50 kDa a été partiellement caractérisée, et ne possède pas d'homologie de séquence avec les immunophilines. Par contre, elle possède une activité enzymatique de type protéine phosphatase, impliquée notamment dans la régulation de l'activité de la PKA. Cependant, son activité ne semble pas perturbée en présence des immunosuppresseurs (Donnelly & Soldin, 1994).

Mais les récepteurs prioritaires de la CsA sont bien sûr les cyclophilines. En effet, nous avons vu qu'elles fixent spécifiquement la CsA avec une forte affinité, mais pas les

dérivés non-immunosuppresseurs. De plus, l'activité immunosuppressive de la CsA nécessite l'association physique du médicament avec ces protéines. Elles sont représentées dans tous les compartiments cellulaires par des isoformes différentes, et peuvent donc influencer la distribution et l'activité du médicament.

L'utilisation du dérivé PL-CS a permis de montrer que la CyPA est le récepteur majoritaire de l'immunosuppresseur dans les lymphocytes alors que la CyPB n'est pas détectable dans ces cellules. Par contre, les deux cyclophilines sont bien représentées dans les cellules MRC5, une lignée fibroblastique résistante à la CsA. Ces résultats suggèrent que la concentration relative des isoformes, et par conséquent la répartition de la CsA dans les compartiments cellulaires, peut influencer la sensibilité cellulaire vis à vis de l'immunosuppresseur (Foxwell *et al.*, 1992 ; Ryffel *et al.*, 1992).

La surexpression des CyPA et CyPB provoque une augmentation de sensibilité à la CsA *in vivo* (Bram *et al.*, 1993). L'implication de la CyPA n'est pas surprenante, étant donné son abondance et sa co-localisation avec la calcineurine dans le cytosol. Par contre, cela était plus surprenant pour la CyPB jusqu'à ce que son rôle dans la régulation d'une étape de la voie de transduction Ca^{2+} -dépendante, en association avec la CAML, fut découvert (Bram & Crabtree, 1994). Par contre, la surexpression de la CyPC n'a pas d'effet sur la sensibilité à la CsA. Cependant, le remplacement de son extrémité Ct par celle de la CyPB restaure une activité à la CyPC, alors que les chimères de CyPB flanquées des extrémités Nt ou Ct de la CyPC perdent leur "activité immunosuppressive". Ces résultats suggèrent que, soit les peptides spécifiques de la CyPB interagissent directement dans les mécanismes sensibles à la CsA, soit les CyPB et CyPC ne sont pas localisées dans le même compartiment, et les peptides terminaux dirigent spécifiquement la CyPB dans un lieu où elle peut induire une activité immunosuppressive.

Un autre argument en faveur du rôle de la compartimentation des cyclophilines dans la sensibilité à la CsA est apporté par les études de toxicité de la CsA chez la levure. En effet, la délétion des gènes codant pour les cyclophilines n'a pas d'effet néfaste sur la croissance des levures. De plus, la suppression spécifique de la *CYP1* (CyPA) protège les cellules de l'action toxique de la CsA, suggérant que cette cyclophiline est directement impliquée dans les mécanismes de toxicité. Par contre, la délétion du gène de la *CYP2* (CyPB) ne protège pas la cellule de la CsA, démontrant que seule l'isoforme cytosolique est impliquée dans la toxicité (Koser *et al.*, 1991).

β. les récepteurs membranaires

La présence de récepteurs de CsA a été recherchée à la surface des lymphocytes dans le but d'expliquer la sélectivité d'action du médicament. Ainsi, des études de fixation supposaient l'existence de récepteurs spécifiques de la CsA avec un Kd de 120 nM et 7.10^5 sites/cellule. Cependant, les conditions expérimentales ne permettaient de savoir si ces récepteurs étaient membranaires ou intracellulaires (Ryffel *et al.*, 1982). Des études comparées de fixation et d'incorporation de la CsA dans des liposomes et des lymphocytes ne permettaient pas de conclure à la présence de récepteurs spécifiques, et suggéraient que le médicament entrait dans les cellules en passant librement à travers la bicouche lipidique en raison de sa grande lipophilie (Legrue *et al.*, 1983). Plus récemment, la présence d'un récepteur membranaire a été recherchée à l'aide d'un dérivé macromoléculaire hydrosoluble de la CsA. Ce composé provoque l'agglutination spécifique des lymphocytes T et B, des thymocytes et des cellules de lignées T lymphoblastiques mais pas des cellules des lignées épithéliales HeLa, Vero et COS. Par contre, un décapage membranaire à la trypsine, un large excès de CsA libre et des anticorps anti-CsA inhibent cette agglutination, ce qui suppose l'existence d'un récepteur spécifique à la surface des lymphocytes. Ce récepteur serait directement fonctionnel puisque le dérivé macromoléculaire inhibe la synthèse d'IL-2 par le lymphocyte activé sans être incorporé dans la cellule (Cacalano *et al.*, 1992 ; Erlanger, 1992). Cependant, aucune protéine correspondant à ce récepteur n'a pu être caractérisée à la surface des lymphocytes.

Un récepteur non spécifique de la CsA est présent à la surface de nombreuses cellules. Cette protéine, la P-glycoprotéine ou gp170, est surtout représentée à la surface des cellules cancéreuses et fonctionne comme un transporteur non spécifique ATP-dépendant. Elle exporte activement les composés lipidiques hors de la cellule, particulièrement les médicaments anti-cancéreux, phénomène appelé Multi-Drug Resistance (MDR) (Higgins, 1993). La CsA se fixe à ce transporteur (Foxwell *et al.*, 1989b) et inhibe son activité MDR, ce qui explique l'utilisation de l'immunosuppresseur en tant qu'agent révertant dans les traitements anti-cancéreux *in vitro* et en thérapie clinique (Tamai & Safa, 1991). La P-glycoprotéine est normalement présente à la surface des hépatocytes et des cellules mononucléées du sang, mais en quantité variable en fonction des différentes populations. Ainsi, elle est présente à la surface des lymphocytes T-8, des lymphocytes B exprimant des IgG de surface et des cellules NK, mais elle est absente des monocytes et peu représentée dans les lymphocytes T-4 (Chaudhary *et al.*, 1992). Elle se comporte comme un transporteur saturable de la CsA et exporte activement le médicament, suggérant

que son expression peut être responsable de phénomènes de résistance par épuraison du médicament hors de la cellule (Saeki *et al.*, 1993).

γ. les récepteurs extracellulaires

La CsA extracellulaire est largement associée aux protéines plasmatiques et plus particulièrement aux lipoprotéines. Cette fraction représente 33% du taux circulant de médicament, le reste étant essentiellement associé aux hématies. La CsA soluble se répartit de la façon suivante : 43 à 63% est liée aux HDL, 25 à 34% aux LDL, 5% aux VLDL, et 5 à 15% aux autres protéines, essentiellement à la sérum-albumine. A peine 0,5% du médicament est retrouvé libre dans le plasma. Les lipoprotéines incorporent la CsA sans doute en raison de son importante lipophilie et correspondent à des transporteurs plutôt qu'à des récepteurs spécifiques. Elles peuvent cependant jouer un rôle important dans la clairance hépatique du médicament, et influencer sa distribution, notamment en favorisant son incorporation par l'intermédiaire de leurs récepteurs membranaires (Barre, 1992).

L'IL-8 est une cytokine très importante dans les mécanismes inflammatoires. Elle possède une puissante activité chimiotactile pour les neutrophiles et les lymphocytes *in vitro* et est responsable de l'accumulation massive de ces cellules sur les lieux de l'inflammation *in vivo* (Larsen *et al.*, 1989). Récemment, l'analyse d'anticorps polyclonaux anti-IL-8 a permis de caractériser un antisérum possédant des réactions croisées avec les cyclophilines, malgré l'absence d'homologies de séquence. Cependant, la forme dimérique de l'IL-8 présente des homologies conformationnelles avec les cyclophilines. Les deux protéines ont une structure globale en feuillets β antiparallèles, deux hélices α et un tryptophane exposé. De plus, ce dimère est capable de fixer spécifiquement la CsA, mais avec une affinité moindre de celle des cyclophilines. Cette propriété pourrait être à l'origine des effets anti-inflammatoires de la CsA, par inhibition du chimiotactisme induit par cette cytokine (Bang *et al.*, 1993).

Des cyclophilines à activité chimiotactile ont également été caractérisées chez le rat et la souris. Ces protéines de 18 kDa seraient sécrétées en réponse à un signal extracellulaire, par les macrophages activés par le LPS et par les cellules de l'utérus en réponse aux oestrogènes (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992). Une CyP-22 est également sécrétée par les fibroblastes activés par le FGF, mais aucune activité ne lui a été associée (Davis *et al.*, 1991). Ces protéines n'ont pas été caractérisées chez l'Homme, mais la CyPA a été détectée dans le plasma humain par dosage ELISA (Ryffel *et al.*, 1991) et la CyPB a été purifiée à partir du lait de Femme (Spik *et al.*, 1991). Ces différentes cyclophilines

extracellulaires pourraient être impliquées dans des mécanismes inflammatoires tout comme l'IL-8, mécanismes inhibés en présence de CsA. En effet, nous avons vu que le rejet de greffe est composé de deux phases, une phase de sensibilisation impliquant surtout les lymphocytes T auxiliaires, et une phase effectrice nécessitant l'action des lymphocytes T cytotoxiques. La CsA pourrait ainsi intervenir dans ces deux phases, en inhibant l'activation Ca^{2+} -dépendante des cellules T et en bloquant la migration des cellules effectrices, et donc leur accumulation dans le greffon. Cependant, cette activité chimiotactile nécessite l'existence de récepteurs membranaires, récepteurs qui n'ont pas encore été caractérisés.

La distribution subcellulaire de la CsA et la localisation des principaux récepteurs du médicament sont résumées dans le tableau 6, p. 71.

TABLEAU 6 : Répartition de la CsA dans les compartiments subcellulaires et principaux récepteurs identifiés.

| Compartiment | CsA (%) | Protéine | Référence |
|------------------------|---------|-------------|-------------------------------------|
| Cytosol | 81,5 | CyPA | Handschumacher <i>et al.</i> , 1984 |
| | | CyP40 | Kieffer <i>et al.</i> , 1993 |
| | | Calmoduline | Colombani <i>et al.</i> , 1985 |
| | | Actine | Moss <i>et al.</i> , 1992 |
| Noyau | 5,5 | CyPA | Ryffel <i>et al.</i> , 1991 |
| Mitochondrie | 4 | CyPD | Inoue <i>et al.</i> , 1993 |
| Microsomes | 7 | CyPB | Hasel <i>et al.</i> , 1991 |
| | | CyPC | Friedman & Weissman, 1991 |
| Membrane plasmique | 2 | CyPB | Price <i>et al.</i> , 1994 |
| | | NK-TR | Anderson <i>et al.</i> , 1993 |
| | | GP-170 | Foxwell <i>et al.</i> , 1989 |
| Milieu extracellulaire | - | CyP18 | Sherry <i>et al.</i> , 1991 |
| | | | Xu <i>et al.</i> , 1991 |
| | | CyPB | Spik <i>et al.</i> , 1991 |
| | | IL-8 | Bang <i>et al.</i> , 1993 |

Répartition subcellulaire de la CsA d'après Thalhammer *et al.*, 1992.

IV. Conclusion

Les cyclophilines sont les récepteurs majoritaires de la CsA, en ce sens qu'elles fixent spécifiquement l'immunosuppresseur avec une forte affinité, et qu'elles sont largement représentées dans tous les compartiments subcellulaires.

Les travaux récents sur le mode d'action de la CsA ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'immunosuppression, de caractériser la calcineurine comme étant l'enzyme clé de l'activation Ca^{2+} -dépendante du lymphocyte T, et de confirmer l'importance du facteur de transcription essentiel à la synthèse de l'IL-2, le NF-AT.

L'action de la CsA nécessite la formation d'un complexe avec une cyclophiline. Cependant, toutes les isoformes ne conduisent pas à la formation de complexes immunosuppresseurs. Le meilleur candidat pour la médiation de l'effet de la CsA est la CyPA. En effet, cette isoforme est très largement répandue dans toutes les cellules où elle représente en général plus de 80% des différentes cyclophilines. De plus, elle est co-localisée dans le cytosol avec la calcineurine, et le complexe CyPA/CsA peut interagir physiquement avec la phosphatase et inhiber son activité enzymatique.

Le rôle des cyclophilines dans les mécanismes de sensibilité lymphocytaire et de toxicité n'est pas connu. La CyPA est présente dans toutes les cellules à une concentration telle que seule une fraction minime est complexée à la CsA. Il semble donc peu probable que cette isoforme soit à l'origine de variations de susceptibilité cellulaire. Par contre, les cyclophilines mineures peuvent intervenir dans de nombreux mécanismes. La CyPD peut être à l'origine de manifestations toxiques, par un dysfonctionnement du canal calcique mitochondrial. La localisation restreinte de la CyPC chez la souris avait suggéré le rôle possible de cette isoforme dans la néphrotoxicité, mais sa caractérisation récente dans tous les tissus humains va à l'encontre de cette hypothèse. Quant à la CyPB, certains travaux suggèrent son intervention dans de nombreux mécanismes de résistance ou de sensibilité à l'action de la CsA. En effet, la surexpression de la CyPB augmente la sensibilité des lymphocytes pour la CsA. L'identification de la CAML suggère que la CyPB intervient dans une étape de l'activation Ca^{2+} -dépendante sensible à la CsA, mais différente de l'étape inhibée par le complexe CyPA/CsA. Par contre, un taux très élevé de CyPB serait impliqué dans des phénomènes de résistance, sans doute par une séquestration du médicament dans des compartiments subcellulaires empêchant toute interaction avec la CyPA et la calcineurine. La caractérisation de la CyPB dans le lait de Femme suggère que cette protéine peut être présente dans les autres liquides biologiques et intervenir dans des

mécanismes inflammatoires sensibles à la CsA. De plus, elle pourrait complexer la CsA avant qu'elle ne diffuse dans les cellules et la cibler vers des cellules exprimant un récepteur spécifique.

Afin de mieux comprendre le rôle de la CyPB dans la médiation de l'activité immunosuppressive de la CsA, nous avons étudié dans un premier temps la répartition de la CyPB dans les compartiments du sang humain. Les nombreux travaux sur la localisation des cyclophilines dans les tissus humains montrent une certaine confusion entre les différentes isoformes, sans doute liée au taux élevé de conservation structurale conduisant à des phénomènes de réactions croisées. Nous avons donc dû mettre au point une méthode capable de discriminer la CyPB des autres isoformes, et plus particulièrement de la CyPA. Ayant confirmé la présence de CyPB dans le plasma humain, nous avons recherché la présence de récepteurs spécifiques à la surface des cellules circulantes. Nous avons ensuite étudié les propriétés de fixation de la CyPB et du complexe CyPB/CsA, ainsi que le rôle du récepteur en tant que médiateur de l'incorporation du médicament dans les lymphocytes.

Travaux personnels

DISTRIBUTION RELATIVE DE LA CyPA ET DE LA CyPB DANS LES COMPARTIMENTS DU SANG HUMAIN

I. Introduction

Les cyclophilines sont représentées dans les différents compartiments subcellulaires par différentes isoformes, les deux plus importantes étant la CyPA majoritairement localisée dans le cytosol, et la CyPB associée aux vésicules intracellulaires. En raison de son abondance et de sa co-localisation avec la calcineurine, la CyPA représente la cible privilégiée de l'action de la CsA. Par contre, le rôle de la CyPB dans la médiation de l'activité de l'immunosuppresseur n'est pas connu.

Au Laboratoire, une cyclophiline de 21 kDa a été purifiée à partir du lait de Femme et caractérisée comme étant une forme sécrétée de la CyPB (Spik *et al.*, 1991). La présence de cette isoforme dans le lait suggérerait qu'elle puisse être sécrétée dans les autres liquides biologiques, et en particulier dans le plasma. D'autres cyclophilines sécrétées ont également été décrites et partiellement caractérisées. Ainsi, Ryffel *et al.* (1991) mentionnent la présence de CyPA dans le plasma humain. Ce résultat est surprenant étant donné que l'ARNm de la CyPA ne code pas pour un peptide signal qui dirigerait la protéine dans la voie de sécrétion. Par contre, la CyPB est présente dans la lumière des vésicules intracellulaires et sa découverte dans le lait est en faveur de sa sécrétion. Étant donné le pourcentage élevé d'homologie de séquence entre les deux isoformes, il est probable que les anticorps anti-CyPA soient à l'origine de réactions croisées. De plus, la méthode de dosage utilisée repose sur la capture des cyclophilines par formation d'un complexe avec un dérivé de CsA immobilisé. Elle est donc difficilement utilisable pour mesurer les taux de cyclophilines dans le sang d'individus greffés traités à la CsA.

Afin d'étudier le rôle de la CyPB dans l'action de la CsA, il était nécessaire dans un premier temps de mettre au point un dosage capable de discriminer cette isoforme de la CyPA et de les quantifier même en présence de l'immunosuppresseur. Afin de résoudre ces problèmes, nous avons choisi de produire des anticorps sélectifs dirigés contre les régions les plus divergentes des deux protéines et éloignées du site de fixation de la CsA.

II. Résultats

Ces travaux ont fait l'objet du premier article,

Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies

publié dans la revue : *Journal of Immunological Methods*, vol. 178, p. 113-120.

Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies

Fabrice Allain¹, Christophe Boutillon², Christophe Mariller¹ and Geneviève Spik¹

¹Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Villeneuve d'Ascq, France and ²Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Unité de Recherche Associée du CNRS n°1319, Lille, France.

Correspondence to: Prof G. Spik., Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, Tel. (33).20.43.41.55., Fax. (33).20.43.65.55, Bitnet : Geneviève.Spik @ omega.univ-lille1.fr

Abbreviations: CyP, cyclophilin; CyPA, cyclophilin A; CyPB, cyclophilin B; CsA, cyclosporin A; PBS, phosphate-buffered saline; KLH, keyhole limpet hemocyanin; OPD, ortho-phenylenediamine; BSA, bovine serum albumin

Abstract

Cyclophilins A and B (CyPA and CyPB) are known to be the main binding proteins for cyclosporin A (CsA), a potent immunosuppressive drug. Due to the high homology between the two proteins, antibodies to CyPB were found to cross-react with CyPA. In order to avoid this phenomenon, we raised specific antibodies against peptides copying the most divergent parts of the two sequences. These antibodies allowed us to develop an ELISA capture assay selective for either isotype. Thus, we showed that leukocyte CyPB concentration was almost ten times lower than that of CyPA, and that in contrast to the results described in the literature, only CyPB was released in plasma. Moreover, CyPB levels in leukocytes and plasma were found to correlate for the same donor, but no relationship was found with CyPA level.

Key words : Cyclophilin, Cyclosporin A, ELISA, Anti-peptide antibody

1. Introduction

Cyclophilins are ubiquitous, highly conserved proteins, known to accelerate the *cis-trans* isomerization of Xaa-Pro peptide bonds (Fischer et al., 1989; Takahashi et al., 1989). The most abundant isoform, an 18-kDa protein termed cyclophilin A (CyPA), is the major intracellular target for cyclosporin A (CsA) (Handschumacher et al., 1984), a potent immunosuppressive drug widely used to prevent graft rejection (Borel, 1986). The action of CsA leads to the suppression of T-helper lymphocyte activation, in blocking the transcriptional activation of many genes essential in the immune response (Emmel et al., 1989; Schreiber, 1991). We have recently reported the identification of a 21-kDa secreted CyP in human milk (Spik et al., 1991) and an almost identical S-cyclophilin has been described in embryonic chick tissues (Caroni et al., 1991). This protein has been called cyclophilin B (CyPB) (Price et al., 1991), and found to be ubiquitous and abundant in endoplasmic réticulum (Hasel et al., 1991; Bergsma et al., 1991). Like the cytosolic CyPA, CyPB possesses peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activity, and binds CsA with high specificity, indicating that the two proteins are functionally related (Spik et al., 1991; Price et al., 1991).

CyPB is known to be retained in reticulum vesicles by its C-terminal extension (Arber et al., 1992), but its presence in human milk suggests that it might be secreted in biological fluids, and particularly in plasma. Ryffel et al. (1991) have reported the presence of CyPA in human plasma, but this may be an epiphenomenon since CyPA is known to be a cytosolic protein. However, it may be explained by the high homology between the two CyP(s), leading to a possible cross-reaction of polyclonal antibodies to CyPA.

In the present study, we report the production of antisera specific for CyPA and CyPB, and their use in the development of a solid-phase immunoassay specific for each isoform. We also describe the application of these ELISA methods in the quantitative analysis of CyPA and CyPB levels in plasma and human blood leukocytes. Our results indicate that cellular CyPB concentration is almost ten times lower than that of CyPA, except in neutrophils which exhibit higher CyPB levels and that CyPB, but not CyPA, is present in human plasma.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis and conjugation

Peptides were synthesized using the conventional solid-phase "Boc-benzyl strategy" (Merrifield, 1963) on "Pam" resins (Mitchell et al., 1976) in an automated Applied BioSystem 470A peptide synthesizer, using N,N-dicyclohexylcarbodiimide-hydroxybenzotriazole based coupling procedure. After fluorhydric acid cleavage from the resin in the presence of scavengers, crude deprotected peptides were purified by trifluoroacetic acid/diethylether precipitation followed by gel-permeation. Peptides were characterized by amino-acid analysis after total acid hydrolysis and by analytical reverse phase high performance liquid chromatography. Conjugation of reduced cysteinyl peptides to keyhole limpet hemocyanin (KLH) as carrier protein was carried out by 6-maleimidocaproic N-hydroxysuccinimide as the heterobifunctional cross-linking agent. The peptide content of the conjugates was determined by amino-acid analysis compared to the amino-acid composition of KLH alone.

2.2. Production of specific antisera to CyPA and CyPB

Recombinant CyP(s) were a gift from Sandoz (Basel, Switzerland). Antibodies were raised in the rabbit, by intradermal injections of either recombinant CyPB, or KLH-coupled peptides with Freund's adjuvant (Vaitukaitis et al., 1971). Total immunoglobulin G was purified from the immune serum by selective precipitation with ammonium sulfate and gel filtration on Sephacryl S-300 (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Antibody titers were determined using an indirect ELISA method. Briefly, recombinant CyPA and CyPB dissolved in 10 mM carbonate buffer, pH 9.6, were coated to the solid phase. Multiple dilutions of the immune sera were incubated at 37°C for 1 h in phosphate buffer saline (PBS: 10 mM sodium phosphate, 300 mM sodium chloride, pH 7.4) supplemented with 0.05% Tween. After a wash, anti-rabbit immunoglobulin coupled to peroxidase (1/2500) (Diagnostic Pasteur, Marnes-La-Coquette, France) was added and incubation was performed at 37°C for 1 h. The absorbance at 490 nm was measured after hydrolysis of the enzyme substrate *o*-phenylenediamine (OPD : 4 mg diluted in 10 ml PBS-citrate pH 5.5, added to 10 µl of 30% H₂O₂) (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO), using a microplate

reader (Metertech Model 960). The titer was estimated by determining the highest dilution giving an absorbance of 1.

Peroxidase labeling of the antibodies was performed according to Nakane and Kawaoi (1974). 2.5 mg of horseradish peroxidase (EC.1.11.1.7, type VI-A, Sigma Chemicals Co.), previously treated with dinitrofluorobenzene, were submitted to periodic acid oxidation for 30 min at 20°C. The sample was then dialyzed against 10 mM sodium carbonate buffer, pH 9.6, and mixed with 5 mg of purified antibodies for 3 h at 20°C. The conjugate was dialyzed against PBS, purified by gel filtration on Sephacryl S-300 and conserved at -20°C in 40% glycerol.

2.3. Preparation of serum and blood cells

Blood cells were isolated from citrated buffy-coat, obtained from the Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille. After dilution of cell concentrates to the initial volume with isotonic phosphate buffer, blood cells were separated according to the method described by Böyum (1968). Purity of cell populations (85-90%) and cell viability (up to 80%) were estimated by flow cytometry analysis (FACScan Cytofluorimeter, Becton Dickinson). Lysis was performed in PBS containing 1% Triton X-100 and 2 mM of diisopropyl-fluorophosphate at 4°C for 2 h, and lysates were centrifuged at 10000 x g for 30 min. The protein content of supernatants was determined (Peterson, 1977) with bovine serum albumin (BSA) used as a standard, and samples were diluted to a protein concentration of 500 µg/ml.

2.4. Solid-phase immunoassays for CyPA and CyPB

Purified antibodies were diluted to 10 µg/ml in 20 mM sodium carbonate buffer, pH 9.6, added to ELISA microplates and coated overnight at 4°C. The wells were then blocked at 37°C with 3% BSA in PBS for 1 h. Recombinant CyPA or CyPB standards and cell lysates or plasma samples, diluted in PBS, 1% BSA, 0.02% Tween, were added to each well (100 µl) and incubated at 37°C for 2 h. This step was followed by an 2 h incubation at 37°C with peroxidase-labeled antibodies (100 µl per well of conjugate diluted to 1/500 in PBS-BSA-Tween). Between each step, the plates were carefully washed with PBS-0.05% Tween. The absorbance at 490 nm was read after hydrolysis of the enzyme substrate OPD as described above.

CyP concentrations were estimated from at least four measurements per sample. Measurements were expressed as the average of several appropriate dilutions. Sensitivity was calculated from the minimum amount of CyP(s) in diluted samples which gave a mean signal in excess of a value calculated as the mean background signal plus three times its standard deviation. To determine the reproductibility of the assay, three samples displaying different CyP concentrations were analyzed in triplicate in 12 different experiments. The confidence limits were determined from the mean values and their standard deviation and allowed to define error coefficients for the measurements of CyPA and CyPB levels. Correlation coefficients between blood cells and plasma levels were estimated using the computer software KWIKSTAT.

3. Results

3.1. Development of highly specific immunoassays for CyPA and CyPB

To measure selectively CyPA and CyPB levels in mixed samples, it was necessary to develop immunological methods specific for each protein. Due to their high overall homology, the two isoforms were likely to generate cross-reactive antibodies. To raise quite specific antibodies, synthetic peptides copying the most divergent parts of the two sequences were to be used.

3.1.1. Selection of CyPA and CyPB peptides

Two regions in CyPB, the N- and C-terminal extensions, were good candidates for this approach. In contrast, the shorter CyPA is devoid of these extensions and a single region, located in the C-terminal part of the molecule, was suitable. Although it is known that C-terminal peptides are in general suitable for raising anti-protein antibodies, the high homology found in the C-terminal octapeptide of CyPA (158IADCGQLE₁₆₅) precluded the use of this approach. Thus, the peptide (142MERFGSRNGKTSKKITI₁₅₈-C), termed peptide A, which is devoid of this sequence homology (Fig. 1), was synthesized and coupled to KLH through an additional cysteine residue at its COOH-terminus. In the case of CyPB, the two peptides, termed peptide B (170CGKIEVEKPFAlAKE₁₈₄) and peptide C (2DEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV₂₅-C) were synthesized (Fig. 1). Peptide C was coupled to KLH through an additional cysteine added in its COOH-terminus, in order to

expose the N-terminal part, whilst in the other, a cysteine (C₁₇₀) which is present in the native protein was used.

3.1.2. Selection of antibodies to CyPA and CyPB

To verify the cross-reaction properties of polyclonal antisera to CyP(s), antibodies to recombinant CyPB (AbCyPB) were analyzed and compared to anti-peptide antibodies for their ability to recognize both CyPA and CyPB. ELISA experiments showed a titer of 16000 for CyPB, and a lower titer of 1000 for CyPA (Fig.2), confirming the cross-reaction properties of this immune serum. Although AbCyPB permitted quantification of CyPB and/or CyPA, they were nevertheless not able to discriminate CyPA and CyPB in mixed samples. Antibodies to peptide A (AbpA) were found to recognize only CyPA, with an ELISA titer of 3200. Similarly, antibodies to peptides B (AbpB) and C (AbpC) were found to recognize specifically CyPB, with titers of 10000 and 4000, respectively (Fig.2). Although good antibody titers could be detected, only AbpA and AbpB were able to detect specifically the native CyPA and CyPB on immunoblots. AbpC, which recognized other non-specific proteins of the cell homogenate, was not suitable for the two-site ELISA method development (data not shown).

3.1.3. Development of the solid-phase immunoassay for CyP(s)

Immunoassays were performed with AbpA or AbpB coated to the wells of the titration plate. Since AbCyPB recognized both CyPA and CyPB, they were conserved as peroxidase-labeled second antibodies. Standard curves allowed us to quantify CyPA and CyPB with detection limits of 10 ng/ml and 1 ng/ml, respectively. As expected, using these highly specific antisera, no cross-reaction was detectable. When the tests were performed in the presence of an excess of specific peptide, no signal was detected, excluding any non-specific binding of the proteins (Fig.3).

According to the working dilutions of biological samples, our method allowed CyPA and CyPB levels to be measured at a sensitivity of 80 ng/ml and 10 ng/ml in whole blood and plasma, and 40 ng/mg and 5 ng/mg of protein in cell homogenates, respectively. The error coefficients for the measurements of CyPA and CyPB levels were estimated to be 9.5 % and 6.5 %, respectively. Our ELISA method permitted CyPB levels to be quantified with great accuracy and reliability, but was less suitable for the measurement of CyPA concentrations in biological samples. In fact, a lower reproductibility and a 10-fold decrease in sensitivity were observed. These results were not surprising since AbpA

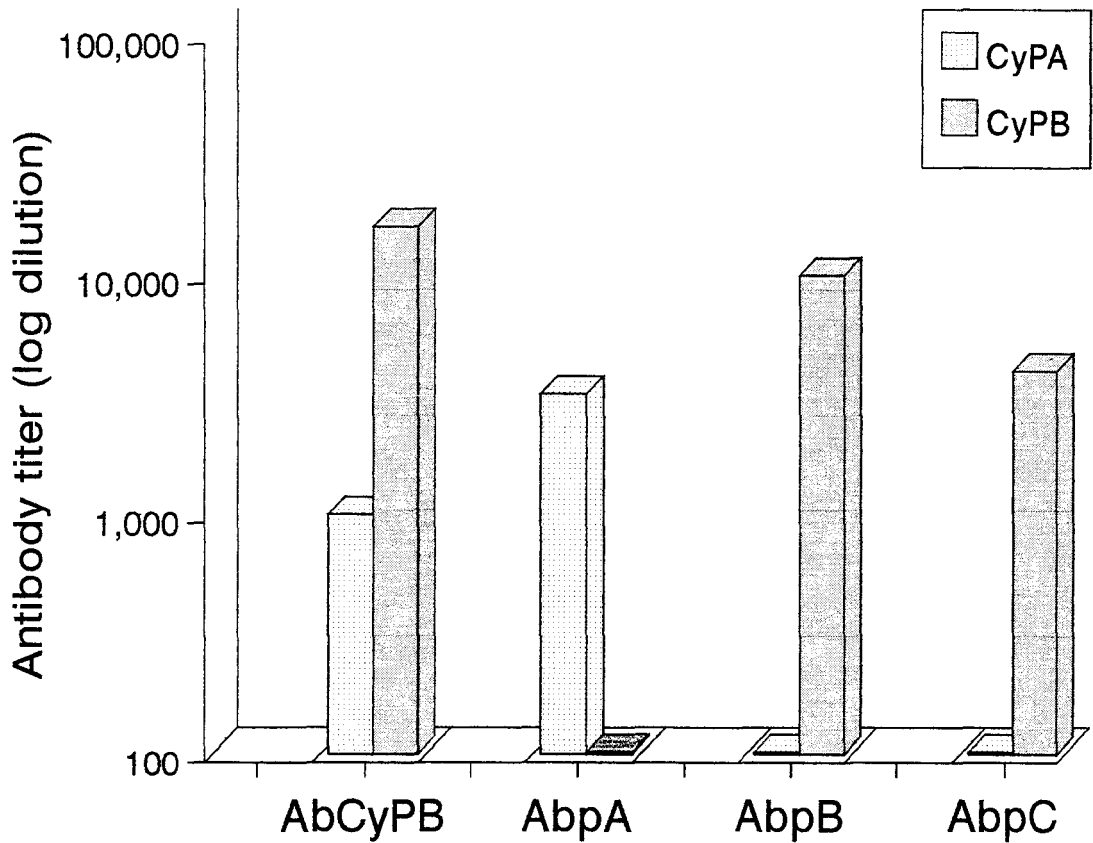


Fig.2. Specificity of antibodies to CyPA and CyPB. The specificity of the antibodies was determined using an indirect ELISA method; antibodies to recombinant CyPB (AbCyPB) and peptides A, B and C (AbpA, AbpB, AbpC, respectively) were allowed to bind either CyPA or CyPB coated to the microtiter plate. The titer was estimated by the highest dilution giving an absorbance of 1.

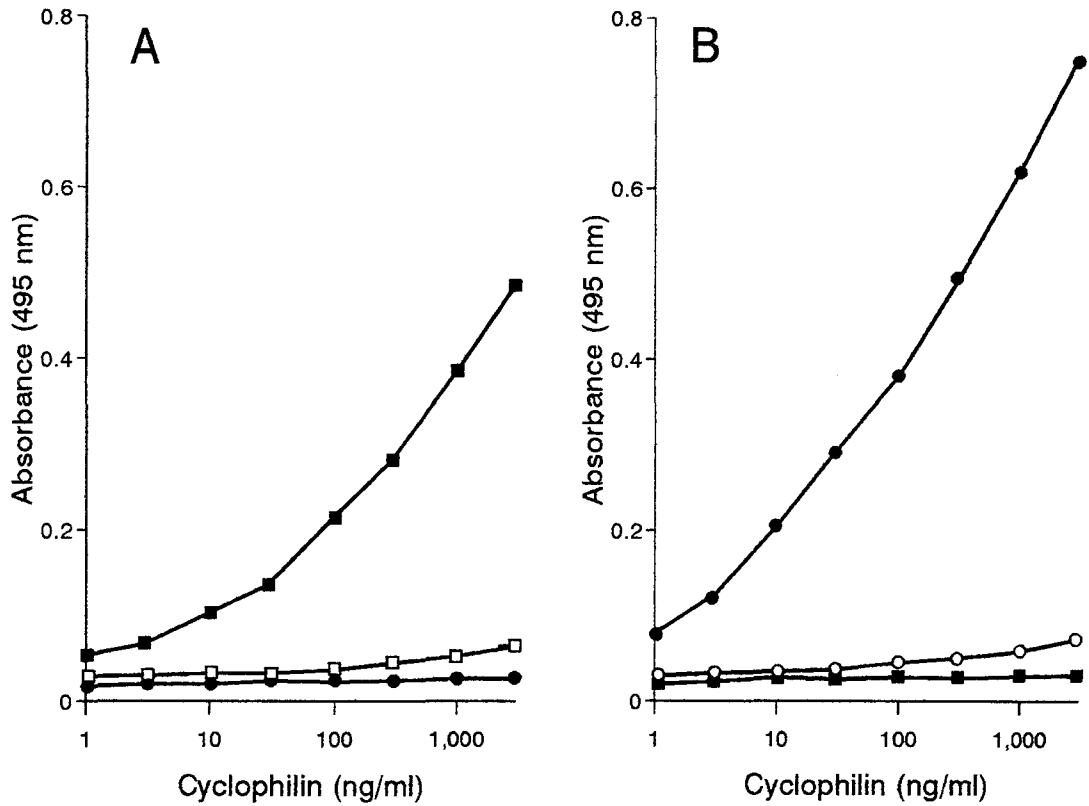


Fig. 3. Standard curves for CyP(s) in the selective ELISA assay. CyPA (■) and CyPB (●) were allowed to interact with antibodies to peptide A (panel A) or to peptide B (panel B) coated to the solid phase. Specificity of CyPA and CyPB recognition was determined in the presence of a 100-fold molar excess of unconjugated peptide A (□) or peptide B (○), respectively.

exhibited a three-fold lower titer for CyPA than did AbpB for CyPB, and the peroxidase-labeled antibodies were more specific for CyPB than CyPA. Nevertheless, our immunoassay was efficient enough to compare CyPA levels to those already reported in the literature (Ryffel et al., 1991) and to discriminate CyPA and CyPB in mixed samples with high specificity.

3.2 .Quantitative analysis of CyP(s) in human blood cells and plasma

CyP(s) levels were first investigated in total human blood, to determine the relative abundance of CyPA and CyPB. The CyPB concentration was found to be much lower than the CyPA level, suggesting that CyPB is barely present in blood cell homogenate. Measurements were then performed in a plasma sample, to determine whether CyPB and CyPA, were released into plasma. CyPB was found at a concentration of 150 ng/ml, but CyPA was not found in the same pool of human plasma, using the method described here (Table 1).

Table 1 : CyPA and CyPB levels in human whole blood and plasma : CyP(s) concentrations as ng/ml.

| | CyPA | CyPB |
|-------------|-------------------|------------|
| Whole blood | 3400 +/- 400 | 240 +/- 90 |
| Plasma | n.d. ¹ | 150 +/- 80 |

Mean values +/- SD (n = 12 healthy donors)

¹ n.d. : not detectable (below the limit of detection)

Measurements were then performed on lysed blood cells and corresponding plasma (n=12), to determine the variations in CyP(s) concentrations and the relationship between CyPA levels and released CyPB levels (Table 2). A large amount of CyPB was associated with white cell lysates, but was not found in erythrocyte lysates. The CyPB contents of lymphocytes and monocytes were comparable, and similar amounts were found in neutrophils, except for two lysates which exhibited higher values. No significant variations were observed in platelets (Fig.4). Calculations of correlation coefficients showed a direct

Table 2 : CyPA and CyPB content of human blood cells : cellular contents expressed as ng/mg protein.

| | CyPA | CyPB |
|-------------|--------------|-------------|
| Lymphocytes | 2100 +/- 300 | 180 +/- 70 |
| Monocytes | 2500 +/- 400 | 250 +/- 60 |
| Neutrophils | 2300 +/- 300 | 350 +/- 270 |
| Platelets | 500 +/- 100 | 280 +/- 20 |

Mean values +/- SD (n = 12 healthy donors)

relationship between the CyPB concentrations of lymphocytes, monocytes and neutrophils from the same individual ($r = 0.82$; $p < 0.02$). In the same way, a high correlation was found between plasma level and white cell content ($r = 0.87$; $p < 0.01$), except for platelets. The specific immunoassay for CyPA yielded similar results to those determined by Ryffel et al. (1991), except in plasma where no CyPA was found with our ELISA method. Moreover, CyPA levels did not correlate with either intracellular CyPB content or with CyPB plasma levels, ($r = 0.47$; $p < 0.38$), suggesting that production of CyPA and CyPB is not related.

4. Discussion

It is now well established that CyPA is the most abundant intracellular member of the CyP family and its quantitative analysis has been reported in human tissues (Ryffel et al., 1991). However, no specific immunoassay has been available to discriminate CyPA and CyPB levels in mixed samples. Differential tissue distribution of these two proteins might help to explain the specificity of CsA action, and assist the investigation of the specific function of these two CyP(s) in immunosuppression. CyPA has been quantified by its ability to bind CsA immobilized to a microtiter plate (Quesniaux et al., 1987). However, such a method did not permit the measurement of CyP levels in cell contents and plasma

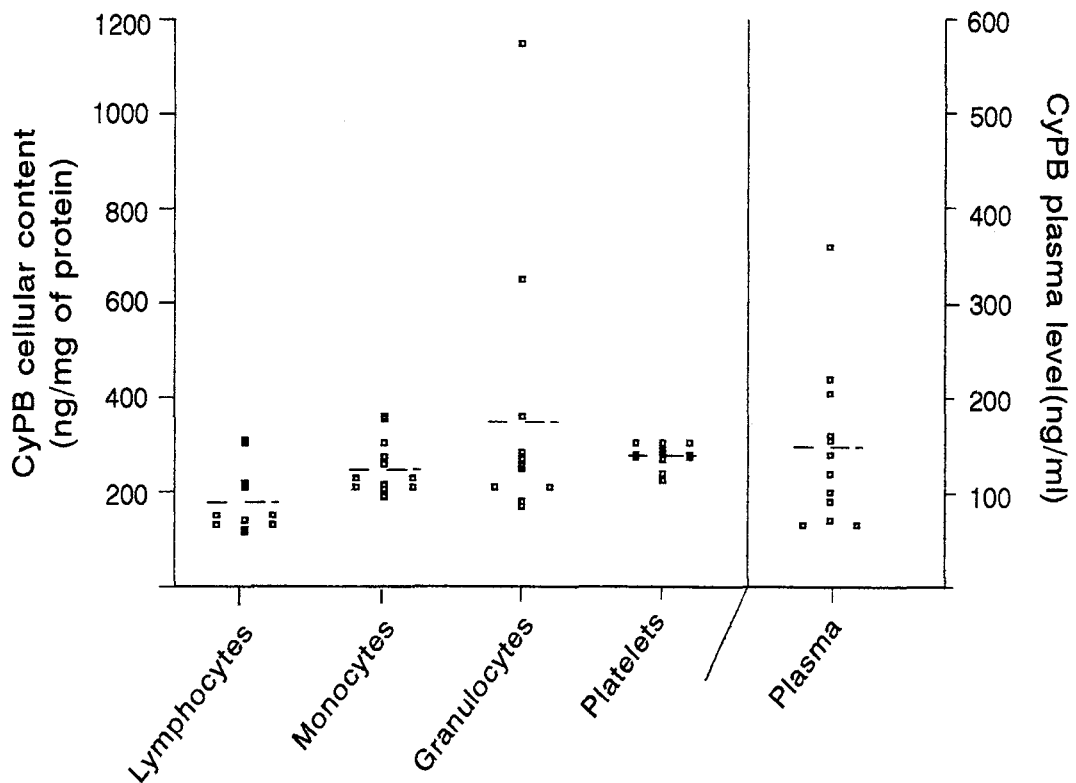


Fig. 4. Individual values of CyPB levels in plasma and blood cell homogenates from 12 healthy volunteers. The data shown are mean values from quadruplicate measurements.

from patients treated with the immunosuppressive drug. Since it is of great interest to reconcile the selectivity of CsA with the universal distribution of CyP(s), it was necessary to develop specific immunological methods able to detect CyPA and CyPB levels without resorting to CsA binding. This has been achieved here.

Several studies have reported the presence of secreted cyclophilin-like proteins (Davis et al., 1991; Sherry et al., 1992) but only Spik et al. (1991) and Caroni et al. (1991) have identified secreted CyP(s) as CyPB. Although CyPA has been found in human plasma at the level of 0.6 $\mu\text{g/ml}$ (Ryffel et al., 1991), only CyPB and not CyPA were detected in plasma with our specific ELISA methods. Since we showed that antibodies to recombinant CyPB cross-react with CyPA, the protein quantified by Ryffel et al. (1991) may, we suggest, have been CyPB.

Based on RNA hybridization and immunoblotting probes (Bergsma et al., 1991; Foxwell et al., 1992) an ubiquitous distribution of CyPB was expected. In our ELISA investigations, CyPB was found in all cells analyzed, with a mean value of 250 ng per mg of total protein, except for erythrocytes. Measurements showed that the CyPB level was subject to variations, both in cell homogenates as well as in plasma. However, CyPB concentrations in different leukocytes and plasma were highly correlated in the same donor, suggesting that CyPB levels may be related to individual cellular activity. Indeed, CyP(s) are known to be peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (PPIases) and it has been postulated that they are mediators in the folding of native proteins (Fischer and Schmid, 1990). As CyPB is located in the endoplasmic reticulum, its intracellular concentration might vary in response to an increase of synthesis and folding of secreted proteins, such as cytokines. This observation is supported by a recent study which has reported that activation of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A increased mRNA levels of CyP and HSC70, a heat-shock protein well-known to be required in protein folding (Richards et al., 1992). On the other hand, such individual variations of CyPB levels might be important in explaining the selective action of CsA and variations in sensitivity to this immunosuppressive drug. Cells from different donors have been shown to differ in their sensitivity to CsA (Sander et al., 1986; Povlsen et al., 1990). The variations in sensitivity to the drug may be affected by the concentrations of CyP(s). Thus, Foxwell et al. (1992) suggested that the CsA resistance of a lung fibroblast cell line was due to the higher concentration of CyPB than in CsA-sensitive cells, leading to a different accessibility of CsA to CyPA. It was postulated that the selective action of CsA may differ among various cell types through the relative CyP isoform concentrations. Moreover, our results showed

that while CyPB level in blood cells and plasma were correlated within the same donor, no correlation was found between CyPA and CyPB levels. It is conceivable therefore that individual variations of sensitivity to CsA may be due to the relative proportion of CyPA and CyPB, leading to a different subcellular distribution of the drug among sensitive cells of CsA-treated patients.

In summary, we have demonstrated specific quantification of both intracellular CyPA and CyPB, and shown that CyPB may be released in biological fluids. The relative CyP levels in human plasma and/or leukocytes may correlate with the cellular response to CsA. However, the previous immunoassays were neither specific enough to discriminate CyPB from CyPA in mixed samples, nor to measure both CyP isoforms in cell homogenate from CsA-treated patients. Our newly developed immunoassay, using anti-peptide antibodies against the non-homologous sequences of CyPA and CyPB, should contribute to the further elucidation of the relationships between variations in CyP levels and the selective action of CsA on T-lymphocytes. Moreover, it should allow us to assess individual variation of drug sensitivity in CsA-treated patients and provide a better understanding of this process.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Université des Sciences et Technologies de Lille, the Institut Pasteur de Lille, the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111; Director : Prof. A. Verbert, and Unité de Recherche Associée du CNRS n°1319; Director : Prof. A. Tartar) and by grants from the European Economic Community (Biomed program contract n° BMH1-CT93-1748).

We are grateful to Dr. M. Zurini (Sandoz, Basel, Switzerland) for the gift of recombinant CyP(s) and to Dr. D. Brevière (Centre Régional de Transfusion Sanguine, Lille, France) for blood samples. We are especially grateful to Prof. J.P. Dessaint (Service d'Immunologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, France) for experimental help and critically reading the manuscript, and to Prof. J. Montreuil, Prof. A. Tartar and Dr. A. Corfield for their helpful discussions and valuable advice.

References

- Arber, S., Krause, K.H. and Caroni, P. (1992) S-Cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J. Cell. Biol.* 116, 113.
- Bergsma, D.J., Eder, C., Gross, M., Kersten, H., Sylvester, D., Appelbaum, E., Cusimano, D., Livi, G.P., McLaughlin, M.M., Kasoyan, K., Porter, T.G., Silverman, C., Dunnington, D., Hand, A., Prichett, W.P., Bossard, M.J., Brandt, M. and Levy, M.A. (1991) The cyclophilin multigene family of peptidyl prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* 266, 23204.
- Borel, J.F. (1986) Cyclosporin. *Prog. Allergy* 38, 9.
- Böyum, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Invest.*, 21., p. 77.
- Caroni, P., Rothenfluh, A., McGlynn, E. and Schneider, C. (1991) S-cyclophilin. New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 266, 10739.
- Davis, T.R., Tabatabai, L., Bruns, K., Hamilton, R.T. and Nilsen-Hamilton, M. (1991) Basic fibroblast growth factor induces 3T3 fibroblasts to synthesize and secrete a cyclophilin-like protein and β_2 -microglobulin. *Biochim. Biophys. Acta* 1095, 145.
- Emmel, E.A., Verweij, C.L., Durand, D.B., Higgins, K.M., Lacy, E. and Crabtree, G.R. (1989) Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T-cell activation. *Science* 246, 1617.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Kiefhaber, T. and Schmid, F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 476.
- Fischer, G. and Schmid, F.X. (1990) The mechanism of protein folding. Implications of *in vitro* refolding models for *de novo* protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* 29, 2205.
- Foxwell, B.M.J., Woerly, G., Husi, H., Mackie, A., Quesniaux, V.F.J., Hiestand, P.C., Wenger, R.M. and Ryffel, B. (1992) Identification of several cyclosporin binding proteins in lymphoid and non-lymphoid cells *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 113, 115.
- Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J. and Speicher, D.W. (1984) Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544.

- Hasel, K.W., Glass, J.R., Godbout, M. and Sutcliffe, J.G. (1991) An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3484.
- Merrifield, R.B. (1963) Solid-phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2219.
- Mitchell, A.R., Erickson, B.W., Ryabtsev, M.N., Hodges, R.S. and Merrifield, R.B. (1976) Tert-butoxycarbonylaminoacyl- 4- (oxymethyl)-phenylacetamidomethyl resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 7358.
- Nakane, P.K. and Kawaoi, A. (1974) Peroxidase labelled antibody, a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084.
- Peterson, G.L. (1977.) Modified procedure for protein assay. *Anal. Biochem.* 83, 344.
- Povlsen, J.V., Rasmussen, A., Madsen, M. and Lamm, L.U. (1990) Cyclosporin-induced immunosuppression *in vitro*: variation in sensitivity and binding capacity. *Scand. J. Immunol.* 32, 45.
- Price, E.R., Zydowsky, L.D., Jin, M.J., Baker, C.H., McKeon, F.D. and Walsh, C.T. (1991) Human cyclophilin B : A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1903.
- Quesniaux, V.F.J., Schreier, M.H., Wenger, R.M., Hiestand, P.C., Harding, M. and Van Regenmortel, M. (1987) Cyclophilin binds to the region of cyclosporin involved in its immunosuppressive activity. *Eur. J. Immunol.* 17, 1359.
- Richards, F.M., Milner, J. and Metcalfe, S. (1992) Inhibition of the serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A in lymphocytes: effect on mRNA levels for interleukin-2, IL-2Ra, krox-24, p53, hsc70 and cyclophilin. *Immunology* 76, 642.
- Ryffel, B., Woerly, G., Greiner, B., Haendler, B., Mihatsch, M.J. and Foxwell, B.M.J. (1991) Distribution of the cyclosporin binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* 72, 399.
- Sander, B., Brigati, C. and Möller, E. (1986) Inhibition of *in vitro* alloreactivity by cyclosporin A: evidence for inter-individual variation in sensitivity. *Scand. J. Immunol.* 23, 435.
- Schreiber, S.L. (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251, 283.
- Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A. and Cerami, A. (1992) Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3511.

- Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H., Keller, R., Hiestand, P.C. and Movva, N.R. (1991) A novel, secreted, cyclophilin-like protein (SCYLP). *J. Biol. Chem.* 266, 10735.
- Takahashi, N., Hayano, T. and Suzuki, M. (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337, 473.
- Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E. and Ross, G.T. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol.* 33, 988.

III. Conclusion

Les anticorps dirigés contre les peptides synthétiques copiant les extrémités C-terminales divergentes de la CyPA et de la CyPB se sont révélés de précieux outils pour reconnaître sélectivement les deux isoformes sans risque de réactions croisées. Leur utilisation nous a permis de développer une méthode de dosage ELISA et de quantifier les deux protéines dans les cellules du sang. Nous avons ainsi pu montrer que la CyPB est présente dans les leucocytes circulants à un taux moyen de 250 ng par mg de protéines, dix fois inférieur à celui de la CyPA. De plus, les anticorps anti-peptides nous ont permis de démontrer que seule la CyPB était présente dans le plasma.

Afin de compléter ce résultat, nous avons recherché la CyPB dans les surnageants de cellules en culture. La protéine n'a pas été détectée ni dans les milieux de lignées humaines lymphoblastiques T ou B, myéloblastique, mégacaryoblastique et épithéliale de glande mammaire, ni dans le surnageant de lymphocytes circulants activés *in vitro*. Par contre, la protéine a été retrouvée (50-100 ng/ml) dans les milieux de lignées hépatocytaires, fibroblastique, et granulocytaire. Ces résultats suggèrent que seules certaines cellules sont impliquées dans la sécrétion de la CyPB, ce qui pourrait expliquer les résultats divergents dans la littérature sur la localisation de la protéine. En fonction de la nature de la cellule étudiée, la CyPB pourrait être soit retenue dans les vésicules du réticulum endoplasmique (Arber et al, 1991), soit sécrétée dans le milieu (Price et al., 1994).

Enfin, nous avons montré qu'il n'y avait pas de relation entre les taux de CyPA et de CyPB dans les leucocytes d'une même personne, suggérant que la concentration relative des deux isoformes peut varier individuellement et influencer la disponibilité intracellulaire du médicament. Notre dosage sélectif pourra être utilisé par la suite afin de rechercher d'éventuelles relations entre les concentrations des deux isoformes chez les individus greffés et les variations de sensibilité à la CsA.

CARACTERISATION D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA CyPB A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES T HUMAINS

I. Introduction

La recherche de cyclophilines (CyPA et CyPB) dans le sang humain nous a permis de montrer que la CyPB était présente dans le plasma, suggérant qu'une fraction mineure de cette isoforme n'était pas retenue dans les vésicules intracellulaires et sécrétée dans le milieu extracellulaire. Des activités biologiques associées à des cyclophilines sécrétées ont été mentionnées dans la littérature. Ainsi, la CyPB de Poulet aurait une activité facteur de croissance pour les cellules embryonnaires (Caroni *et al.*, 1991). De même, des Cyp-18 sécrétées auraient une activité chimiotactile pour les leucocytes polymorphonucléaires et les monocytes (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992), suggérant que les cyclophilines peuvent interagir avec des protéines membranaires.

Afin de comprendre le rôle de la CyPB dans le plasma et son implication dans les mécanismes de l'immunosuppression, nous avons recherché d'éventuelles propriétés de fixation à la surface des lymphocytes T du sang et de cellules de lignées lymphoblastiques humaines. Nous avons ensuite étudié les caractéristiques de fixation et le devenir de la protéine en utilisant comme modèle d'étude la lignée T Jurkat.

II. Résultats

Les résultats obtenus ont fait l'objet de notre seconde publication,

Characterization of Surface Binding Sites for Cyclophilin B on a Human Tumor T-cell Line

publiée dans la revue : *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, p. 16537-16540.

**Characterization of Surface Binding Sites for Cyclophilin B on
a Human Tumor T-cell Line***

Short title : *Cyclophilin B Binding to Lymphocyte Membrane*

Fabrice Allain, Agnès Denys and Geneviève Spik ¶

From the Laboratoire de Chimie Biologique

Université des Sciences et Technologies de Lille

Unité Mixte de Recherche du C. N. R. S. n°111, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Abstract

Cyclophilin B (CyPB) is a cyclosporin binding protein, known to be located mainly within the endoplasmic reticulum vesicles. Its previous characterization in human milk implies that the protein may be released from the secretory pathway and recovered in biological fluids. In an attempt to understand the role of the extracellular CyPB, we have investigated the binding capacity of the protein to cells derived from human T and B lymphocytes. We present here evidence that CyPB binds to T lymphocytes and that the binding to the Jurkat T-cell surface is specific, saturable and reversible. The dissociation constant K_d was 12 nM and the number of binding sites was estimated to 35,000/cell. We report that the surface-bound CyPB was internalized at 37°C and subsequently degraded in the cell. We also show that the immunosuppressive drug, cyclosporin A does not inhibit the surface binding of CyPB, and does not interfere with internalization of the protein. These results support the hypothesis that the selective action of the immunosuppressive drug results in part from its interaction with the extracellular form of CyPB.

Cyclophilins are ubiquitous, highly conserved proteins known to be the main binding proteins for the immunosuppressive drug cyclosporin A (CsA)¹ (1,2). They are also termed peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases (PPIases), as they are able to accelerate the *cis-trans* isomerization of artificial substrates and the refolding of denatured proteins (3,4). The enzymatic property of cyclophilins is strongly inhibited by CsA, but the relevance of this activity to the intracellular function of the cyclophilins remains yet unknown. Cyclophilins have been classified into several isoforms, and at least three cDNAs from human tissues encoding distinct cyclophilins have been reported (5-7). The first characterized isoform corresponds to cyclophilin A (CyPA), a soluble, cytosolic and abundant protein. This protein has been considered to be the major target of the immunosuppressive drug. The second cyclophilin is termed human cyclophilin B (CyPB), and its mRNA encodes a hydrophobic extension that directs the protein to some portion of the endoplasmic reticulum (8,9). The third one, (hCyP3), is likely to be the mitochondrial isoform of the cyclophilin family (10). Moreover, we have already reported the purification of a 21-kDa secreted cyclophilin in human milk (11). This protein was first named SCYLP (Secretory Cyclophilin-like Protein), before its identity with the human CyPB isoform was ascertained. Recently, we have characterized its presence in human plasma. This result suggests that a minor fraction of the intracellular CyPB may be released through the secretion pathway and recovered in the extracellular space. Some authors have also reported the presence of secreted cyclophilins in biological fluids (12,13) and in culture medium supernatants (14,15). The presence of these proteins in the extracellular medium suggests that they may interact with some cell-membrane proteins. This interaction might in turn lead to biological activities through surface binding activity. Indeed, embryonic chick CyPB was found to possess growth factor activity *in vitro* (16). Other secreted cyclophilins were shown to trigger a chemotactic response from polymorphonuclear leukocytes and monocytes (13,15).

In an attempt to understand the role of released CyPB in human blood, we have investigated the binding capacity of this protein to human leukocytes and cell lines. In this study, we have analyzed the properties of CyPB binding to T- and B-cells. Using the Jurkat human T-cell line as a cellular model, we show that CyPB specifically binds cell surface, and that catalytic and CsA-binding sites do not seem to be involved in these interactions. Furthermore, our results demonstrate that surface-bound CyPB is partially internalized and subsequently degraded in the cell. This raises the possibility that extracellular CyPB could be related to CsA immunosuppression through its binding to T-lymphocyte surface and may thus contribute to explain the selective action of this drug on the immune system.



EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials - CsA and recombinant human CyPA and CyPB were a generous gift from Sandoz (Basel, Switzerland).

Cell Culture - Jurkat, Molt-4, HSB2 T-cell and LiCr B-cell line were obtained from the Institut Pasteur de Lille and Raji B-cell line from the Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille. Human peripheral lymphocytes were obtained from venous blood and activated by anti-CD3 (Immunotech), as previously described (17). Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies Inc.) containing 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, gentamycin (5 µg/ml), pH 7.3, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Cultures were diluted every two days, in order to maintain cell concentration from 0.5 to 1.10⁶ cells/ml.

Preparation of ¹²⁵I-CyPB - ¹²⁵I-CyPB was obtained by incubating 100 µg of protein with 0.3 mCi of carrier-free Na¹²⁵I (Amersham Corp.) in presence of 100 µg of Iodo-Gen (Pierce Chemicals Co.) for 15 min at room temperature. Free iodine was removed by gel filtration on a Sephadex G-25 PD-10 column. The specific radioactivity ranged over 4-6 X 10⁶ cpm/µg.

Preparation of CyPB-CsA Complex - The complex was obtained by incubating CyPB with a 10-fold molar excess of CsA for 30 min at room temperature, and non-complexed CsA was removed by hydrophobic chromatography on a Sephadex LH-20 column, as previously described (11).

Preparation of Polyclonal Antibodies - Antibodies to CyPB were raised in the rabbit, by intradermal injections of recombinant CyPB with Freund's adjuvant (18).

Flow Cytometry Analysis - Cells were washed twice by centrifugation for 5 min at 400 X g, in cold Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Sigma), and resuspended in DPBS supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA), to obtain a final concentration of 10⁶ cells/ml. Cells (10⁶ /sample) were incubated in presence of various CyPB concentrations for 1h at 4°C and rapidly washed three times in DPBS. The pellets were resuspended in DPBS-BSA added with anti-CyPB antibodies (1/1000), for 1h at 4°C. After a wash, fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (1/80) (Sigma) were added to the cell suspension for 30 min at 4°C. Data were monitored on a Becton-Dickinson FACscan cytofluorimeter. The light-scatter channels were set on a linear gain and the fluorescence channels were set on a logarithmic scale. Cells were gated for forward- and side-angle light scatters, and 5000 fluorescent particles of the gated population

were analyzed. The data collected with logarithmic amplification were analyzed by a Becton-Dickinson computer.

Surface Binding Assay of ^{125}I -CyPB - Cells were washed twice as above and diluted in DPBS-BSA to a final concentration of 4×10^6 cells/ml. They were incubated in polyethylene tubes (2×10^6 cells per sample) for 1 h at 4°C with various concentrations of ^{125}I -CyPB. Non-specific binding was determined in parallel experiments in the presence of a 500-fold molar excess of unlabelled CyPB. After incubation, cells were centrifuged ($400 \times \text{g}$, 5 min) and washed three times with 3 ml of cold DPBS. Cell-associated radioactivity was measured using a 1282 Compugamma LKB-Wallac gamma counter. Non-specific binding was subtracted from total counts to determine specific binding.

Specificity of CyPB binding was studied by incubating cells with 50 nM of ^{125}I -CyPB and various concentrations of CyPB, CyPB-CsA complex, CyPA and lysozyme. After 1 h of incubation at 4°C , cells were isolated as above and the pellets counted to determine remaining cell-associated radioactivity.

Binding, Dissociation and Internalization Kinetics of ^{125}I -CyPB - Two different methods were applied to measure the kinetics of the binding of ^{125}I -CyPB to Jurkat T-cells. In both experiments, cells ($4 \cdot 10^6$ /ml) were incubated in RPMI 1640, 20 mM Hepes, pH 7.4, supplemented with 0.5% BSA. ^{125}I -CyPB was added to a final concentration of 50 nM.

In the first method, cells were allowed to bind ^{125}I -CyPB for various times at 4°C or 37°C . After washing off excess of unbound CyPB, cells were resuspended in 1 ml of ice-cold DPBS containing 0.01% Pronase E (Merck) for 30 min at 4°C . The supernatants were then separated from the cellular pellets and the amount of radioactivity in each fraction was measured.

In the second method, cells were either pretreated with chloroquine (200 μM) for 30 min at 37°C and then allowed to bind ^{125}I -CyPB for 1h at 4°C , or directly incubated in the presence of radio-iodinated ligand in the same conditions. After a wash, cells were resuspended in prewarmed binding medium at 37°C . At various times, aliquots of cell suspension were removed and all the subsequent steps were performed at 4°C . Cell-free supernatants were collected and cells were treated with Pronase as described above. The surface-bound, internalized and released ^{125}I -CyPB were counted in Pronase-sensitive eluate, cell extract and incubation medium, respectively. To determine the degradation of internalized CyPB, supernatants were precipitated with 10% trichloroacetic acid (v/v), 20

min at 4°C, and centrifuged 30 min at 10,000 X g; the intact and degraded ¹²⁵I-CyPB were counted in precipitated and soluble extracts, respectively.

For all experiments, non-specific binding was determined as described above.

RESULTS

Surface-Binding of CyPB - The binding of CyPB to Jurkat T-cells was first investigated by flow cytometry, in order to determine the binding activity concentration range. Cell surface binding was observed from 5 nM, and the mean value of fluorescence intensity reached a plateau starting from 50 nM (Fig.1A). These results suggest that CyPB binding was concentration-dependent and that the saturation occurred at a protein concentration of 50 nM. As this method was not sensitive enough to determine the binding parameters and did not allow subtraction of any nonspecific interactions of CyPB with the cell membrane, the quantification of CyPB binding was then investigated by using radioiodinated ligand. Nonspecific binding, obtained in the presence of a 500-fold molar excess of unlabeled CyPB, was subtracted from total counts in order to obtain specific binding (Fig.1B). As expected, the binding was found to be concentration-dependent and saturable from 50 nM, confirming thus our previous results. Scatchard analysis of the binding data resulted in a linear plot (Fig.1B, *inset*) compatible with non-cooperative ligand binding to one homogeneous site. The apparent dissociation constant K_d was 12 +/- 2 nM and the number of binding sites was estimated to 35,000 +/- 1700 / cell.

CyPB binding to the human Molt-4 and HSB2 T-cell lines, and to peripheral blood T lymphocytes was also investigated, and similar values of K_d and number of binding sites were obtained. Furthermore, no significant difference was observed in CyPB binding to resting *versus* CD3-activated T-lymphocytes. In contrast, no binding was observed to the human Raji and LiCr B-cell lines, according to the relative sensitivity of the two methods we used (data not shown). These results suggest that only T-cells are able to express highly specific surface-binding sites for CyPB and that activation of peripheral blood T-lymphocytes has no effect on the CyPB binding site expression.

Competitive Binding Experiments - The specificity of CyPB binding was examined by competitive binding to Jurkat T-cells with different ligands (Fig.2). In the first experiments, cells were incubated with ¹²⁵I-CyPB in the presence of unlabeled CyPB or CsA-complexed CyPB. ¹²⁵I-CyPB binding was specifically inhibited by 45% and 65% in

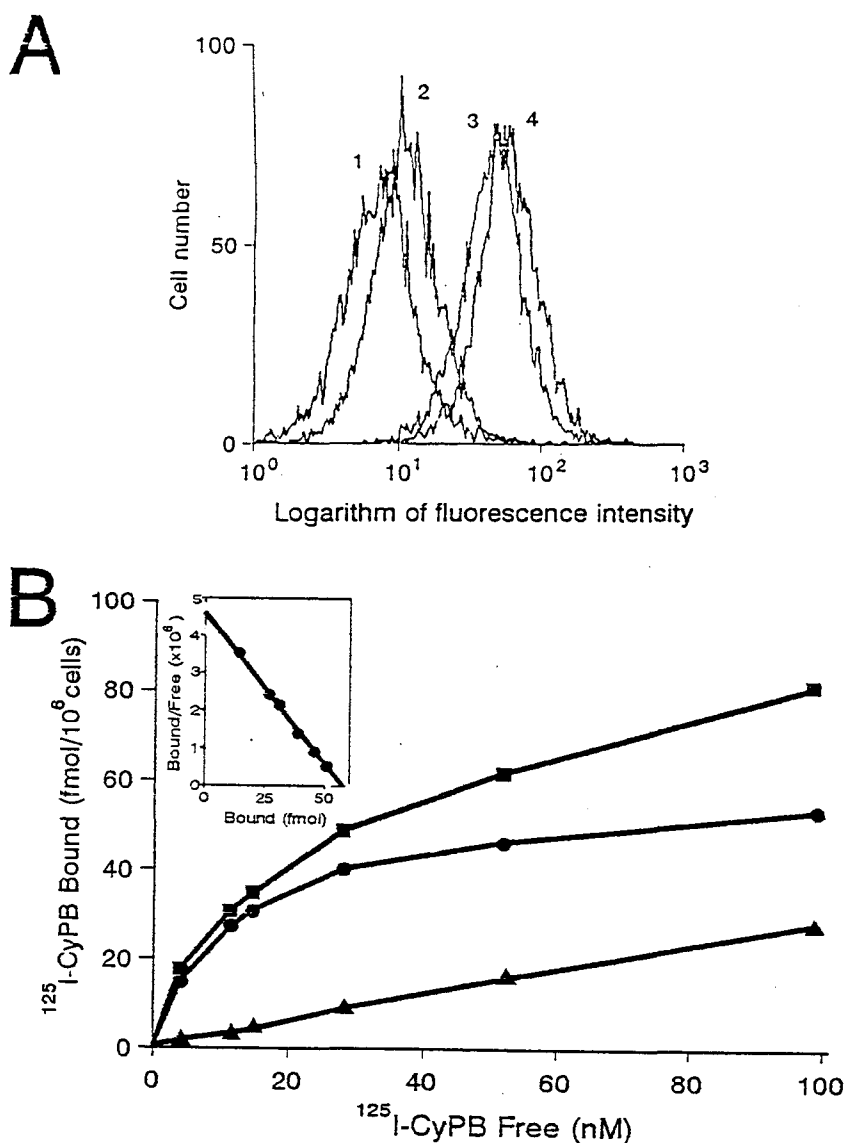


Fig. 1. Surface binding of CyPB to Jurkat T-cell. *Panel A* : Surface binding of CyPB analyzed by flow cytometry. Cells ($10^6/\text{ml}$) were allowed to bind CyPB for 1h at 4°C . After a wash, surface-bound ligand was detected by using an indirect double-antibody method, as described under "Experimental Procedures". The dose-dependent binding was studied in adding CyPB at various concentrations : *trace 1*. control; *trace 2*. 5 nM CyPB; *trace 3*. 50 nM CyPB; *trace 4*. 100 nM CyPB. *Panel B* : Surface binding assays of ^{125}I -CyPB. Dose-dependence and saturation of CyPB binding were studied by incubating cells ($4 \cdot 10^6/\text{ml}$) for 1h at 4°C with the indicated concentrations of radiolabeled CyPB. The specific binding (●) was obtained after subtraction of the non-specific (▲) from total counts (■). Points represent the mean values of triplicate at each ligand concentration. *Inset* is the Scatchard plot of the binding data.

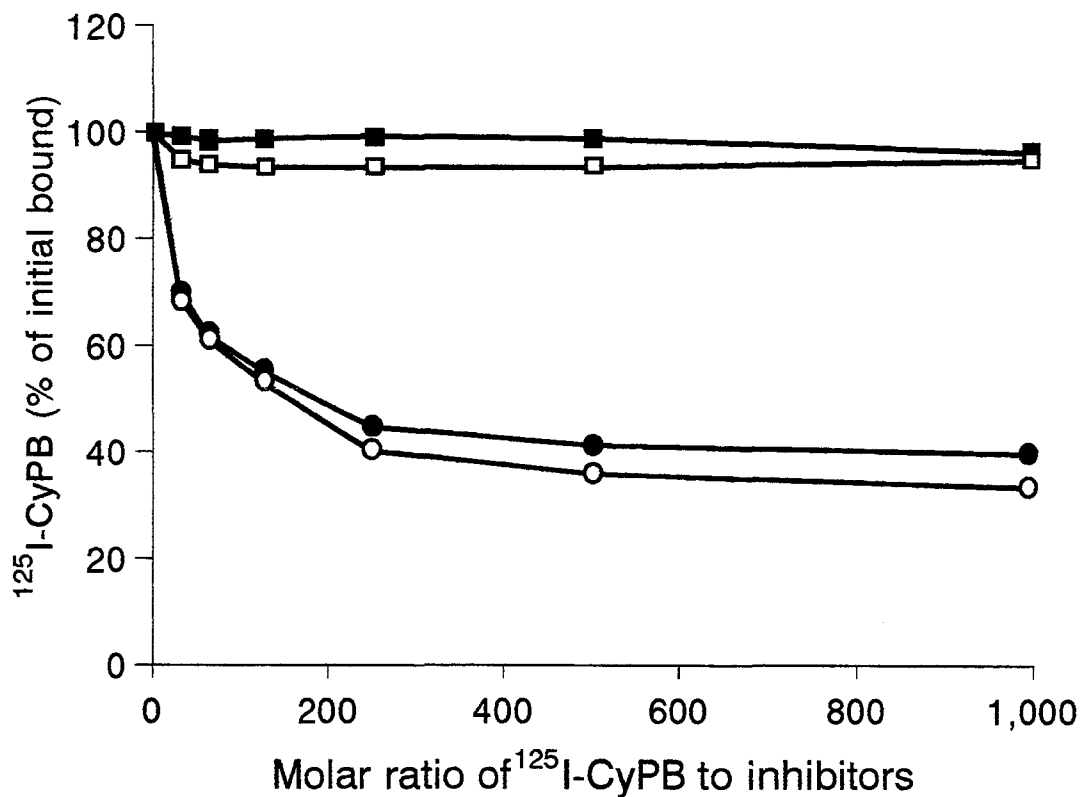


Fig. 2. Competitive ^{125}I -CyPB binding experiments to Jurkat T-cells. Competitive binding experiments were performed by incubating cells in presence of 50 nM ^{125}I -CyPB and either unlabeled CyPB (●), CyPA (■), CsA-CyPB complex (○) or lysozyme (□) at the indicated molar excesses. After 1 h at 4°C, cells were washed and remaining cell surface radioactivity was counted.

presence of 100 and 1,000 molar-excesses unlabeled CyPB, respectively. On the other hand, CsA-complexed CyPB inhibited ^{125}I -CyPB binding to the same extent as unlabeled CyPB, suggesting that the immunosuppressive drug has no effect on CyPB binding to Jurkat T-cells. CyPB is known to be a highly basic protein and might interact nonspecifically with cell membrane through electrostatic interactions. The fact that lysozyme, another highly basic protein of similar molecular mass, had no inhibitory effect on the binding of ^{125}I -CyPB excludes the binding of CyPB to cell surface through such nonspecific ionic interactions. Competitive binding experiments were also performed in presence of CyPA to see whether this protein, which is structurally similar to CyPB, binds to the CyPB binding sites on Jurkat T-cells. No inhibitory effect was observed during these binding assays, suggesting that homologous peptidic regions of cyclophilins are not involved in CyPB recognition to the Jurkat T-cell surface.

Endocytosis of CyPB - To determine whether CyPB was internalized into Jurkat T-cells, we investigated the kinetics of binding of the radioiodinated protein. Kinetics were performed directly at 4°C (Fig.3A) and at 37°C (Fig.3B), in the presence of 50 nM ^{125}I -CyPB. During the first few minutes, the rate of binding was constant, and the binding equilibrium was reached after 40 min. At 4°C, almost 90% of surface-bound CyPB was removed by Pronase treatment. At 37°C, the amount of CyPB associated to cells was almost 2-fold higher than at 4°C. In this case, bound CyPB was Pronase-sensitive during the initial incubation time points, but the Pronase-resistant fraction increased with time to reach a plateau corresponding to almost 35% of cell-associated CyPB. The difference between the protein binding at 4°C and at 37°C and the fact that large amounts of ^{125}I -CyPB became protected from proteolysis at 37°C, might be due to endocytosis of surface-bound CyPB. This phenomenon was likely to be a temperature-sensitive process since no significant Pronase-resistant fraction was measured at 4°C. These experiments were also repeated in presence of the preformed CyPB-CsA complex, with similar conclusions. These results suggest that CsA did not interfere in the internalization process of CyPB. This in turn leads us to speculate that extracellular CyPB might target the drug into T-cells.

To study the endocytosis process of CyPB, cells were first incubated at 4°C for 1 h until the binding site occupancy reached a steady state. After washing off the unbound ligand, cells were incubated at 37°C and distribution of surface-bound, internalized and released radioactivities were counted at various times. During the first 5 minutes, the

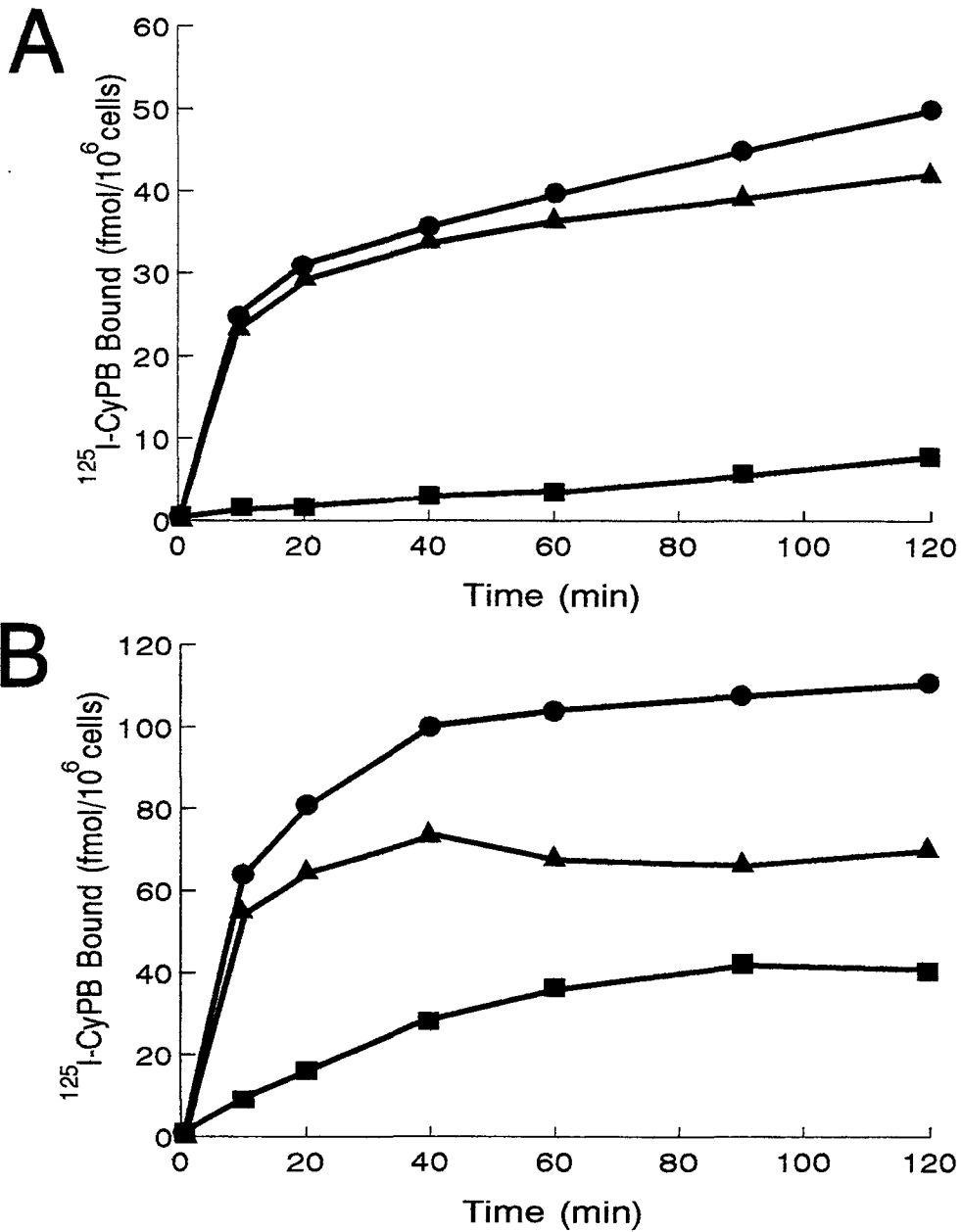


Fig. 3. Time course of membrane binding and internalization of $^{125}\text{I-CyPB}$ in Jurkat T-cells. Cells ($4 \cdot 10^6/\text{ml}$) were incubated with 50 nM of $^{125}\text{I-CyPB}$ at either 4°C (A) or 37°C (B). At the indicated times, cells were washed and treated with Pronase as described under "Materials and Methods". Surface-bound (\blacktriangle) and internalized (\blacksquare) $^{125}\text{I-CyPB}$ were measured in eluates from Pronase treated cells and in cellular pellets, respectively. Total cell-associated CyPB (\bullet) was considered to be the sum of the two components. Each point represents the mean of triplicate from two separate experiments. Data were corrected for non-specific binding.

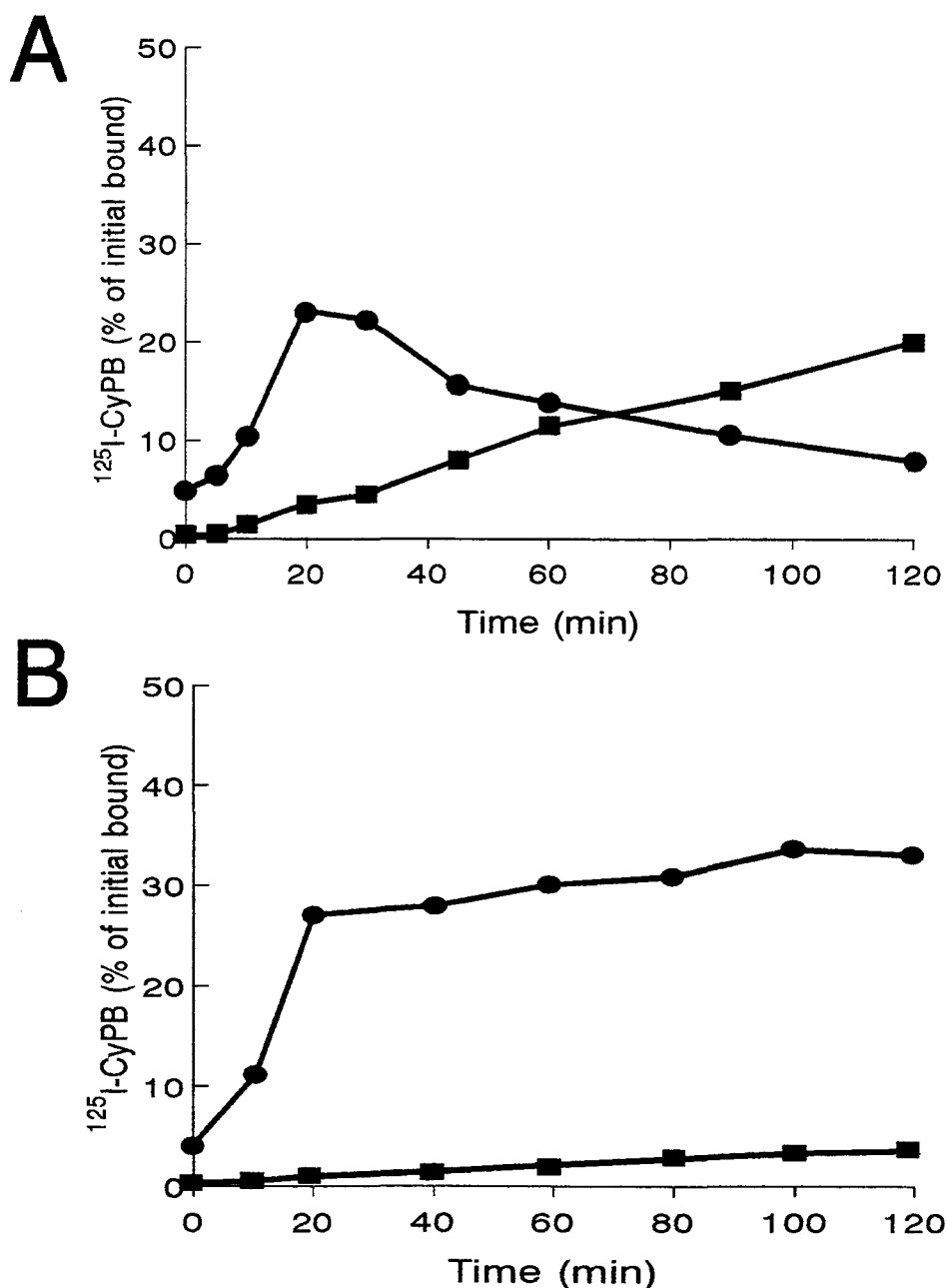


Fig. 4. Time course of the fate of ^{125}I -CyPB surface-bound to the Jurkat T-cells. Both control- (A) and chloroquine-treated (B) cells were incubated with 50 nM of ^{125}I -CyPB for 1h at 4°C . After washing off the unbound ligand, cells were allowed to internalize ^{125}I -CyPB at 37°C . At indicated times, aliquots were removed and incubation supernatants, eluates from Pronase treated cells and cell pellets radioactivities were counted. Ordinates represent the percentages of the total radioactivity initially bound to Jurkat T-cells at 4°C which was segregated within the cells (●), and released in the incubation medium in a degraded form (■).

Pronase-sensitive fraction decreased rapidly, and ^{125}I -CyPB appeared in the supernatant, suggesting an important dissociation from the cell-surface. After this 5-min lag, the Pronase-resistant fraction increased rapidly, until it reached after 20 min a maximum of 23% of the initially bound CyPB. The Pronase-resistant fraction decreased slowly thereafter, as degraded ^{125}I -CyPB started to appear in the incubation medium (Fig.4A). The lysosomotropic agent chloroquine was then tested, in order to see whether increasing the pH of intracellular acidic compartments such as endosomes and lysosomes, could alter the processing of CyPB. In this case, CyPB associated within the cells accumulated and it was no longer released in the medium in a degraded form (Fig.4B). These results suggest that CyPB, after internalization, enters acidic vesicles where it is subsequently degraded.

DISCUSSION

We present here evidence that CyPB binds specifically to surface binding sites on human T-cells but not on-B cells. To our knowledge, this is the first characterization of a CyPB-binding protein on cell surface. Our data are consistent with a specific, reversible and saturable CyPB binding to single, high affinity and non-cooperative sites. At 4°C, the apparent dissociation constant was 12 nM for the Jurkat T-cell line, and there were approximately 35,000 binding sites / cell.

Both CyPA and CyPB exhibit 58% amino acid identity and the similarities are far pronounced in the region involved in the catalytic and CsA-binding sites. The fact that CyPA did not compete with CyPB in the surface binding and that CsA had no inhibitory effect on CyPB binding is in agreement with the existence of a peptidic region of CyPB, non-homologous with CyPA sequence, involved in cell-surface interactions with Jurkat T-cells. Several authors have already reported specific interactions between cyclophilins and other proteins. Thus, a 77-kDa protein has been found to specifically bind the mouse isoform CyPC *in vitro* (19). More recently, the HIV-type I Gag protein has been found to bind specifically both CyPA and CyPB (20). However, CsA has been shown to inhibit the binding activities of these two cyclophilin binding proteins, suggesting the involvement of the highly homologous CsA-binding region of cyclophilins in these interactions. On the other hand, CyPB has been shown to be retained into intracellular vesicles through a specific region located in its C terminus, implying the existence of intravesicular binding sites which recognize the non-homologous C-terminal extension of CyPB (9). Similar

binding sites might be expressed on the Jurkat T-cell surface and thus specifically interact with extracellular CyPB. At 37°C, surface-bound CyPB was partially internalized and intracellular ligand was subsequently degraded and released in the medium in a trichloroacetic acid-soluble form. CsA had no effect on the endocytosis process of CyPB, suggesting that the CyPB-CsA complex might be internalized to the extent as the unbound protein. The fact that extracellular CyPB binds to T lymphocytes and is internalized into these cells raises an intriguing possibility for explaining the immunosuppressive action of the drug.

CsA-mediated immunosuppression is thought to be due to the block in T-cell activation, through the prevention of cytokine gene expression stimulation (21). Recent investigations have shown that cyclophilin mediates the action of CsA by forming a drug-dependent complex and altering the activity of calcineurin, a Ca^{2+} and calmodulin-dependent phosphatase involved in the signaling pathway (22-24). Nevertheless, the mechanisms involved in the cellular selectivity of the action of CsA and the variability of T-cell responses to the immunosuppressive treatment remain unclear (25,26). CsA is thought to enter into cells by partitioning through the phospholipid bilayer and subsequently forming a complex with intracellular cyclophilins. Recently, some authors have reported data that support the presence of a functional CsA receptor on the surface of lymphocytes (27). The existence of CsA receptor might correlate with the selective action of the drug, through its targeting to the surface of selected immune cells. Our results, however, suggest alternative explanations. Resting blood T-lymphocytes were found to bind CyPB to the same extent than Jurkat T-cells. In forming a complex with CsA, extracellular CyPB might specifically target the drug to these CsA-sensitive cells and consequently increase its concentration in their intracellular space. Moreover, the CyPB catalytic activity block by the immunosuppressive drug might lead to the inhibition of a cytokin-like transcellular activity. The possibility that the expression of cell-surface binding sites for CyPB would be related to the immunosuppressive activity requires further investigation and may offer an explanation for the selective nature of CsA treatment.

Acknowledgments - We are grateful to Dr. M. Zurini and Dr. N.R. Movva for the generous gift of human recombinant cyclophilins, to Dr. C. Auriault for the leukemia cell lines and to Prof. S. Ball and J. Montreuil for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J. and Speicher, D.W. (1984) *Science* **226**, 544-547
2. Harding, M.W., Handschumacher, R.E. and Speicher, D.W. (1986) *J.Biol.Chem.* **261**, 8547-8555
3. Fisher, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F.X. (1989) *Nature* **337**, 476-478
4. Takahashi, N., Hayano, T. and Suzuki, M. (1989) *Nature* **337**, 473-475. Haendler, B., Hofer-Warbinek, R. and Hofer, E. (1987) *EMBO J.* **6**, 947-950
6. Price, E.R., Zydowsky, L.D., Jin, M., Baker, C.H., McKeon, F.D. and Walsh, C.T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1903-1907
7. Bergsma, D.J., Eder, C., Gross, M., Kersten, H., Sylvester, D., Appelbaum, E., Cusimano, D., Livi, G.P., McLaughlin, M.M., Kasyan, K., Porter, T.G., Silverman, C., Dunnington, D., Hand, A., Prichett, W.P., Bossard, M.J., Brandt, M. and Levy, M.A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23204-23214
8. Hasel, K.W., Glass, J.R., Godbout, M. and Sutcliffe, J.G. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3484-3491
9. Arber, S., Krause, K.H. and Caroni, P. (1992) *J. Cell. Biol.* **116**, 113-125
10. Inoue, T., Yoshida, Y., Isaka, Y. and Tagawa, K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 857-863
11. Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H., Keller, R., Hiestand, P.C. and Movva, N.R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10735-10738
12. Ryffel, B., Woerly, G., Greiner, B., Haendler, B., Mihatsch, M.J. and Foxwell, M.J. (1991) *Immunology* **72**, 399-404
13. Xu, Q., Leiva, M.C., Fischkoff, S.A., Handschumacher, R.E. and Lyttle, C.R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11968-11971
14. Davis, T.R., Tabatabai, L., Bruns, K., Hamilton, R.T. and Nilsen-Hamilton M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1095**, 145-152
15. Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A. and Cerami A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3511-3515
16. Caroni, P., Rothenfluh, A., McGlynn, E. and Schneider C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10739-10742

17. Yang, S.Y., Chovaito, S. and Dupont, B. (1986) *J. Immunol.* **137**, 1097-1100
18. Vaitukaitis, J., Robbins J.B., Nieschlag, E. and Ross, G.T. (1971) *J. Clin. Endocrinol.* **33**, 988-991
19. Friedman, J. and Weissman, I. (1991) *Cell* **66**, 799-806
20. Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G.V. and Goff, S.P. (1993) *Cell* **73**, 1067-1078
21. Emmel, E.A., Verweij, C.L., Durand, D.B., Higgins, K.M., Lacy, E and Crabtree, G.R. (1989) *Science* **246**, 1617-1620
22. Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman I. and Schreiber, S.L. (1991) *Cell* **66**, 807-815
23. Liu, J., Albers, M.W., Wandless, T.J., Luan, S., Alberg, D.G., Belshaw, P.J., Cohen, P., McKintosh, C., Klee, C.B. and Schreiber, S.L. (1992) *Biochemistry* **31**, 3896-3901
24. Schreiber, S.L. (1992) *Cell* **70**, 365-368
25. Sander, B., Brigati, C. and Möller, E. (1986) *Scand. J. Immunol.* **23**, 435-440
26. Povlsen, J.V., Rasmussen, A., Madsen, M. and Lamm, L.U. (1990) *Scand. J. Immunol.* **32**, 45-51
27. Cacalano, N.A., Chen, B.X., Cleveland, W.L. and Erlanger, B.F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4353-4357

*This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche du CNRS N°111 ; Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires ; Director : Prof. A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille and by grants from the European Economic Community (Biomed program contract n° BMH1-CT93-1748).

¹ The abbreviations used are : CsA, cyclosporin A; CyPA, cyclophilin A; CyPB, cyclophilin B; CyPC, cyclophilin C; DPBS, Dulbecco's phosphate buffered saline; BSA, bovine serum albumin.

III. Conclusion

L'utilisation de CyPB radiomarquée nous a permis de montrer que cette protéine se fixait de façon spécifique à la surface des cellules T humaines, issues du sang ou de lignées lymphoblastiques. Par contre, aucune fixation n'a été observée à la surface des cellules B. Nous avons alors poursuivi nos travaux avec les cellules T Jurkat, cette lignée lymphoblastique s'étant révélée être un excellent modèle pour étudier les interactions de la CyPB avec son récepteur membranaire. Nous avons ainsi montré que la protéine était endocytée à 37°C puis dégradée dans la cellule. De plus, la CsA n'inhibe ni les propriétés de fixation, ni le processus d'internalisation.

Les résultats obtenus suggèrent que la CyPB est susceptible d'intervenir dans l'activité immunosuppressive du médicament. En effet, la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes pourrait être à l'origine d'une activité biologique spécifique impliquant son activité enzymatique, la fixation de la CsA ayant pour effet de bloquer le site catalytique et d'inhiber cette éventuelle activité membranaire. De plus, en formant un complexe avec la CsA, la protéine pourrait diriger l'immunosuppresseur vers les cellules exprimant des sites de fixation membranaires et provoquer son internalisation préférentielle dans ces cellules. Ainsi, la CyPB plasmatique pourrait intervenir dans la sélectivité d'action de la CsA et les phénomènes de sensibilité lymphocytaire, par un ciblage du médicament vers les lymphocytes à travers la fixation spécifique du complexe CyPB/CsA.

Nous nous sommes alors intéressé dans la suite de nos travaux au rôle potentiel de la CyPB dans l'incorporation de la CsA dans les cellules du sang.

ROLE DE LA CYPB DANS L'INCORPORATION DE LA CSA DANS LES LYMPHOCYTES T CIRCULANTS.

I. Introduction

Nos travaux précédents nous avaient permis de montrer que la CyPB était présente dans le plasma et qu'elle était capable de se fixer à la surface des lymphocytes T, même en présence de CsA. Ces résultats suggéraient que la CyPB pouvait spécifiquement cibler le médicament et augmenter sa concentration intracellulaire, en dirigeant le complexe CyPB/CsA vers les cellules exprimant le récepteur.

La CsA diffuse normalement dans toutes les cellules du sang. Environ 5 % du taux circulant de médicament est réellement associé aux lymphocytes, le reste étant essentiellement incorporé dans les hématies. La CyPB plasmatique pourrait piéger la CsA avant qu'elle ne pénètre dans la fraction érythrocytaire et la diriger vers les cellules capables de fixer et d'internaliser le complexe CyPB/CsA.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé la fixation de la CyPB et du complexe CyPB/CsA à la surface des lymphocytes du sang, en utilisant un radiomarquage à l'iode pour la protéine, et un dérivé de cyclosporine tritiée pour le complexe. Nous avons ensuite étudié l'incorporation du complexe CyPB/CsA et de la CsA seule dans les lymphocytes isolés ou en mélange avec les autres cellules du sang, afin de rechercher un éventuel ciblage. Enfin, nous avons étudié l'influence de la CyPB sur la distribution de la CsA dans les différents compartiments du sang et sur l'activité immunosuppressive du médicament.

II. Résultats

Ces derniers travaux sont rassemblés dans le troisième article,

Cyclophilin B mediates Cyclosporin A Incorporation in Human Blood T-Lymphocytes through its Specific Binding to Cell Surface

en révision dans *The Journal of Biological Chemistry*

Cyclophilin B mediates Cyclosporin A Incorporation in Human Blood T-Lymphocytes through its Specific Binding to Cell Surface*

Short title : *CyPB-mediated Incorporation of CsA in Blood T-Lymphocytes*

Fabrice Allain, Agnès Denys, and Geneviève Spik[¶]

From the Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité Mixte de Recherche du Centre National de Recherche Scientifique n°111, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abstract

Cyclophilin B (CyPB) is a cyclosporin A (CsA)-binding protein, located within intracellular vesicles and released in biological fluids. In a recent study, we reported the characterization of CyPB surface binding sites on a human tumor T-cell line (Allain et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 16537). CyPB was found to specifically bind to human T-lymphocytes in a dose-dependent, saturable and reversible manner. At 37°C, the surface-bound ligand was partially internalized and subsequently released in the medium in a degraded form. Furthermore, CsA inhibited neither the surface binding nor the internalization process of the protein. These results suggested that extracellular CyPB might target the drug to lymphocyte and consequently increase its intracellular concentration. In an attempt to verify this hypothesis, we have investigated the binding capacity and internalization of the CsA/CyPB complex in human peripheral blood T-lymphocytes. We present here evidence that both CsA/CyPB complex and free CyPB bind to T-lymphocyte surface, with similar values of K_d and number of sites. At 37°C, the complex is internalized, but contrary to the protein, the drug is not released in the medium but accumulates within the cell. We also show that at concentrations ranging in the CyPB surface binding capacity, CsA/CyPB complex targets the drug to lymphocytes and consequently increases its intracellular concentration. In contrast, at higher concentrations, CsA/CyPB complex leads to a disruption in the drug distribution between blood compartments, in comparison with uncomplexed CsA. Finally, we demonstrate that CyPB-complexed CsA is as efficient for immunosuppressive activity as uncomplexed CsA. Taken together, our results support the hypothesis that surface CyPB binding site may be related to the selective and variable action of CsA, through specific binding and targeting of CyPB/CsA complex to peripheral blood T-lymphocytes.

Cyclophilins are represented in human tissues by at least five isoforms (1-5), and exhibit peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity, leading to the *in vitro* cis-trans isomerization of Xaa-Pro peptide bonds (6, 7). However, the relevance of this activity to the biological functions of cyclophilins remains unclear. The clinically useful immunosuppressant drug cyclosporin A (CsA)¹ specifically binds to cyclophilins and abolishes the enzymatic property of these proteins, nevertheless the inhibition of peptidyl prolyl isomerase activity is not directly involved in CsA-mediated immunosuppression. The complex formed by the drug with its receptor was actually found to bind to the phosphatase calcineurine, and consequently inhibit its enzymatic activity (8). Formation of such a ternary complex is thought to be a crucial step which effectively blocks the early T-cell activation cascade and constitutes the base of the immunosuppressive activity of CsA (9, 10).

In organ transplantation, the sensitivity to CsA is a crucial factor for the acceptance of the graft. A high variability is observed among different patients, and several *in vitro* studies have shown large individual variations of lymphocyte response to CsA treatment (11-13). Furthermore, the selective action of the drug towards T-cells remains unclear. The comprehension of the mechanisms involved in cell susceptibility to CsA are very important to optimize immunosuppressant therapy. An interesting field of investigation is to understand the involvement of cyclophilins in these phenomena. Indeed, variations of cell sensitivity to CsA might be related to the relative distribution of the intracellular cyclophilin isoforms. On the other hand, intrinsic differences of lymphocyte susceptibility might be related to variable incorporation of the drug into T-cells. Nevertheless, the presence of surface receptor for CsA remains debated (14,15). We have recently reported the characterization of T-cell surface binding sites for cyclophilin B (CyPB) (16). This cyclophilin isoform is found to be located in reticulum vesicles (17, 18), and released into biological fluids, as human milk and plasma (19, 20). In forming a complex with CsA before it enters the cells, extracellular CyPB might specifically target the drug to T-lymphocytes and consequently increase its concentration in lymphocyte content.

In an attempt to verify this hypothesis, we have investigated the role of CyPB in specific CsA incorporation in T-cells. In our previous work, we had shown by using radioiodinated ligand that CyPB specifically bound to T-cells but not to B-cells (16). The surface-bound protein was partially internalized at 37°C, even in presence of CsA, and subsequently released in the medium in a degraded form. Here, we have first demonstrated specific binding and internalization of the CyPB/CsA complex, by using tritiated CsA as a radiolabeled probe. We have then investigated the influence of CyPB on CsA distribution in

blood compartments, and verified whether the immunosuppressive activity of CsA was still conserved after its CyPB-mediated incorporation. Taken together, our results suggest that CyPB may promote the incorporation of CsA into blood T-cells, without affecting its immunosuppressive activity. This raises the interesting possibility that the CyPB surface binding sites may be related to the selective and variable actions of CsA by targeting the drug to T-lymphocytes and thus increasing its intracellular concentration within these cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials - ^3H -CsA (10.1 Ci/mmol) was a generous gift from Sandoz-France (Rueil-Malmaison, France). It was diluted in ethanol to a concentration of 250 $\mu\text{Ci/ml}$. Recombinant CyPB was produced in collaboration with the Lycée Valentine Labbé (La Madeleine, France), and purified as previously described (19). Rabbit polyclonal antibodies to recombinant CyPB were raised as described (16). Citrated blood was obtained from the Centre Regional de Transfusion Sanguine (Lille, France). The lymphoblastic Jurkat T cell line was routinely cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Inc.) containing 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 25 mM NaHCO_3 , gentamicin (5 $\mu\text{g/ml}$), pH 7.3, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum.

Preparation of Radiolabeled Ligands - ^3H -CsA/CyPB complex was obtained by incubating 100 μg of CyPB with a 10-fold molar excess of ^3H -CsA for 30 min at room temperature. Free CsA was removed by hydrophobic chromatography on a Sephadex LH-20 column (Sigma Chemicals Co.), as described (19). The specific radioactivity was estimated to 0.8-1 $\times 10^6$ cpm/ μg of CyPB, and free ^3H -CsA never exceeded 5% of total radioactivity in our control. ^{125}I -CyPB was obtained as described (16). The specific radioactivity ranged over 4-6 $\times 10^6$ cpm/ μg .

Surface Binding Assay - Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were first isolated by density gradient centrifugation on Lymphoprep separation medium (Nycomed). T-lymphocytes were collected after depletion of monocytes and B-cells, as described (21). Purity of the population and cell viability were estimated by flow cytometry analysis (FACScan Cytometer, Becton Dickinson). Cells were then resuspended in cold Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Sigma) supplemented with 0.5% of bovine serum albumin (BSA) to a final concentration of 4 $\times 10^6$ cells/ml, and allowed to bind either ^3H -CsA/CyPB complex or ^{125}I -CyPB at various concentrations for 1h at 4°C. Incubation (2

X 10^6 cells/sample) was performed in polyethylene tubes in order to limit non-specific adsorption of the ligand on the support. Non-specific binding was determined in presence of a 200-fold molar excess of unlabeled ligand. After incubation, cells were centrifuged (400g, 5 min), washed three times with 4 ml of cold DPBS and lysed by 100 μ l of 0.1 M NaOH. For ^3H -CsA/CyPB complex binding assay, cell lysates and aliquots of binding medium (50 μ l) were resuspended in 3 ml of scintillation liquid (Lumac-LSV), and cell-associated (bound) and soluble (free) radioactivity was counted, using a model LS 6000TA Beckman counter. In the case of ^{125}I -CyPB, cell pellets and incubation medium aliquots were directly counted using a model 1282 Compugamma LKB-Wallac counter.

Internalization Kinetic of ^3H -CsA/CyPB - Cells (4×10^6 /ml) were first allowed to bind the complex for 1 h at 4°C , until the binding site capacity reached a steady state. After a wash, cells were resuspended in pre-warmed binding medium at 37°C . At various times, aliquots (1 ml) of cell suspension were removed and all subsequent steps were performed at 4°C . Cell-free supernatants were collected and cells were submitted to a mild-acid treatment, by resuspending the pellet in 4 ml of ice-cold 50 mM glycine, 100 mM NaCl buffer, pH 4.5, for 10 min. The surface-bound, internalized and released radioactivity was counted in acid-sensitive eluate, cell extract and incubation medium, respectively. Non-specific binding was determined as described above.

Flow Cytofluorimetry Analysis - Blood was first centrifuged at room temperature (1500g, 30 min) in order to separate plasma, leukocytes and erythrocytes. Leukocyte fraction was extensively fractionated in granulocyte, lymphocyte and monocyte populations, according to the procedure described by Böyum (22). Purity of cell populations (85-90%) and cell viability (up to 80%) were estimated by flow cytofluorimetry analysis. B-cells were not depleted from the lymphocyte mixture since they are poorly represented and we have demonstrated in our previous work they did not bind CyPB (16). Cells were then resuspended in cold DPBS-BSA 0.5% (10^6 cells/ml) and incubated in presence of 50 nM of CyPB for 1 h at 4°C . After washing off the unbound ligand, antibody to CyPB was added for 1 h, followed by a last incubation with fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma), as also described (16). For analysis, cells were gated for forward- and side-angle scatters, and data were expressed as the variation of fluorescence mean value without CyPB addition as control.

Incorporation Assay in Blood Samples - Blood was thoroughly washed to remove plasma, in order to avoid individual variation of drug incorporation due to endogenous plasma proteins. Blood cells were pelleted by centrifugation at room temperature, washed

three times with DPBS and resuspended in RPMI 1640, BSA 0,5%, to the initial volume. Samples were incubated in presence of various concentrations of either ^3H -CsA or ^3H -CsA/CyPB for 1 h at 37°C . PBMC were then collected by centrifugation with Lymphoprep, washed extensively and cell-associated radioactivity was counted, as described above. No depletion of B-cells and monocytes was performed in order to avoid the drug release during further manipulations. The CsA distribution analysis was achieved by measuring radioactivity present in supernatant (100 μl) and erythrocyte content (10^8 cells) beside PBMC content.

Analysis of CsA Immunosuppressive Activity - PBMC were collected as above and resuspended in RPMI 1640 medium (10^6 cells/ml), containing 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 25 mM NaHCO_3 , gentamicin (5 $\mu\text{g/ml}$), pH 7.3, and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Cells were stimulated for 72 h in a 96-well plate in presence of a monoclonal anti-CD3 antibody (Immunotech), at 50 ng/ml. Two concentrations of CsA (Sandimmun, Sandoz), CsA/CyPB and CyPB were tested, and assays were performed in triplicate. Cell proliferation was investigated by measuring the incorporation of ^3H -thymidine (18,5 kBq per well) for 5 h before harvesting. Results are expressed as an index of proliferation : 100% is the proliferation obtained without the drug. Lymphocyte activation was visualized by quantifying the expression of CD25 by flow cytometry, using a monoclonal rat anti-CD25 antibody (Immunotech), followed by a fluorescein-conjugated anti-rat IgG antibody (Sigma). The results were expressed as variation of fluorescence mean value, using non-activated cells as control.

RESULTS

Binding of CyP/CsA Complex to Human T-Lymphocytes - The binding capacity of CyPB/CsA complex to peripheral blood T-lymphocytes was investigated by using ^3H -CsA. Cells were allowed to bind various concentrations of preformed ^3H -CsA/CyPB. A 200-fold excess molar of unlabeled complex inhibited the binding of ^3H -CsA/CyPB from 60 to 80 %, suggesting it was specific. After subtraction of non-specific interactions from total counts, the binding was found to be concentration-dependent and saturable (Fig.1). Scatchard analysis resulted in a linear plot compatible with a single affinity (Fig.1, inset). The apparent dissociation constant K_d was 31 ± 9 nM, and the number of binding sites was $40,600 \pm 7600$ per cell ($n=3$).

Radiodinated CyPB was previously shown to bind to Jurkat T-cells with an apparent dissociation constant of 12 nM and a number of binding sites of 35,000/cell (16). Similar experiments were reproduced with the radioiodinated ligand, in order to compare the parameters of both free and CsA-complexed CyPB binding on resting blood T-lymphocytes and Jurkat T-cells (Table 1). The parameters of ^{125}I -CyPB binding to Jurkat T-cells were very similar to those obtained with peripheral blood T-lymphocytes ($K_d = 18 \text{ nM}$; $n = 40.300$), suggesting the CyPB surface binding sites were probably identical membrane proteins in both cell types. Since we have shown that the CyPB/CsA complex inhibited ^{125}I -CyPB for binding to T-cells to the same extent as the uncomplexed protein, it may be postulated that CyPB and CsA/CyPB specifically bind to the same sites on T-cell membrane.

To verify this hypothesis, we also investigated the CyPB/CsA complex binding to Jurkat T-cell surface. The K_d values were similar for both resting blood T-lymphocytes and Jurkat T-cells, and were slightly higher than the ones we obtained in presence of ^{125}I -CyPB. This difference could however be due to the lowest sensitivity in binding assay using tritiated complex instead of the radio-iodinated protein. Moreover, the number of binding sites on blood T-lymphocytes was identical for both free and complexed CyPB, though it was nearly 2-fold higher for ^3H -CsA/CyPB on Jurkat T-cells. This variation was nevertheless not relevant, since we verified that CyPB binding site expression might vary between 25.000 and 80.000 per Jurkat T-cell (unpublished results).

Internalization of CyPB/CsA Complex within Resting Blood T-Lymphocytes - To study whether the binding of CsA/CyPB complex might promote the drug incorporation, cells were first allowed to bind ^3H -CsA/CyPB at 4°C , and distribution of surface-bound, internalized and released radioactivities was then analyzed at 37°C after a mild-acid wash (Fig.2). During the first few minutes, the acid-sensitive fraction decreased rapidly. In the same time, the acid-resistant fraction increased, until it reached a steady state after 20 min of incubation. No significant radioactivity was found in the supernatant, demonstrating the drug was no longer released from the cells. These results suggest that CyPB mediates CsA incorporation through the specific binding of the complex to cell surface, but contrary to the protein which is released in the supernatant in a degraded form, the drug accumulated within the cells. To confirm the involvement of CyPB binding sites in mediated CsA incorporation, similar experiments were attempted in presence of surface-trypsinated lymphocytes (data not shown). Neither specific binding of ^3H -CsA/CyPB complex, nor

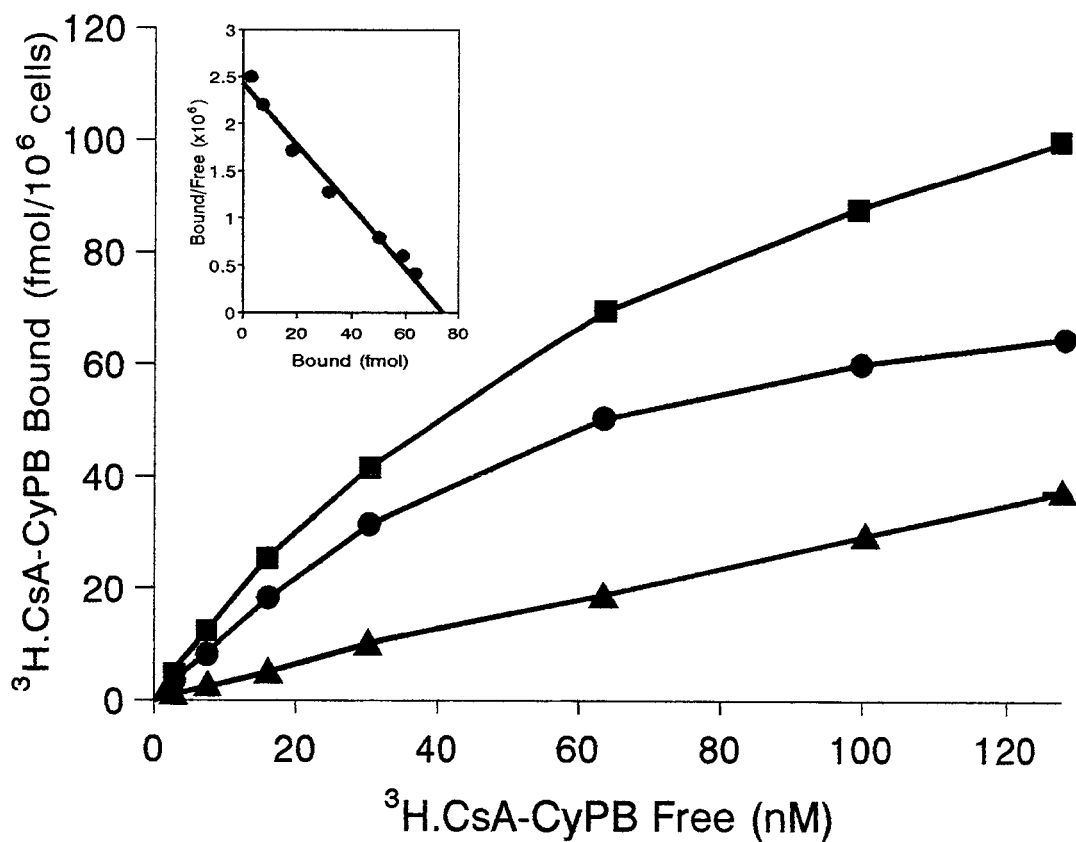


Fig.1. Surface binding of CsA/CyPB to human peripheral blood T-lymphocytes. Dose-dependence and saturation of CsA/CyPB binding were studied by incubating the T-cells for 1 h at 4°C with the indicated concentrations of $^3\text{H-CsA/CyPB}$ complex. The specific binding (●) was obtained after subtraction of non-specific (▲) from total counts (■). Points represent the mean values of triplicate at each ligand concentration. Inset is the Scatchard plot of the binding data.

Table 1. Parameters of CyPB and CsA/CyPB surface binding on human resting peripheral blood T-lymphocytes and lymphoblastic Jurkat T-cells. The binding data were obtained with radioiodinated ligand for CyPB binding, and with tritiated CsA for the drug-complexed protein. The dissociation constants K_d are expressed in nM, and n correspond to the number of ligand binding sites per cell. Data are mean values \pm S.D. from three different experiments.

| | Resting blood T-lymphocytes | | Jurkat T-cells | |
|----------|-----------------------------|-------------------|----------------|-------------------|
| | Kd | n | Kd | n |
| CsA/CyPB | 31 \pm 9 | 40,600 \pm 7600 | 28 \pm 8 | 60,000 \pm 7500 |
| CyPB | 18 \pm 3 | 40,300 \pm 5800 | 12 \pm 2 | 35,000 \pm 1700 |

significant incorporation of the drug were observed, implying the existence of a membrane protein necessary for CyPB-mediated incorporation of CsA in T-lymphocytes

Surface Binding of CyPB to Human Blood Cells - CsA is known to enter blood cells in a non-specific manner, and almost 60% of the drug is recovered in erythrocyte content. The fact that CyPB specifically binds to T-lymphocytes, and mediates the incorporation of the drug into these cells, leads to an interesting way for a selective targeting towards CsA-sensitive cells. To verify this hypothesis, CyPB binding was first investigated on the different blood cell populations, by using flow cytofluorimetry (Fig.3). As expected, we confirmed that only T-lymphocytes bound CyPB. No binding was observed on erythrocytes and monocytes, and the variation of fluorescence mean value was not relevant enough to conclude to any CyPB binding to granulocytes.

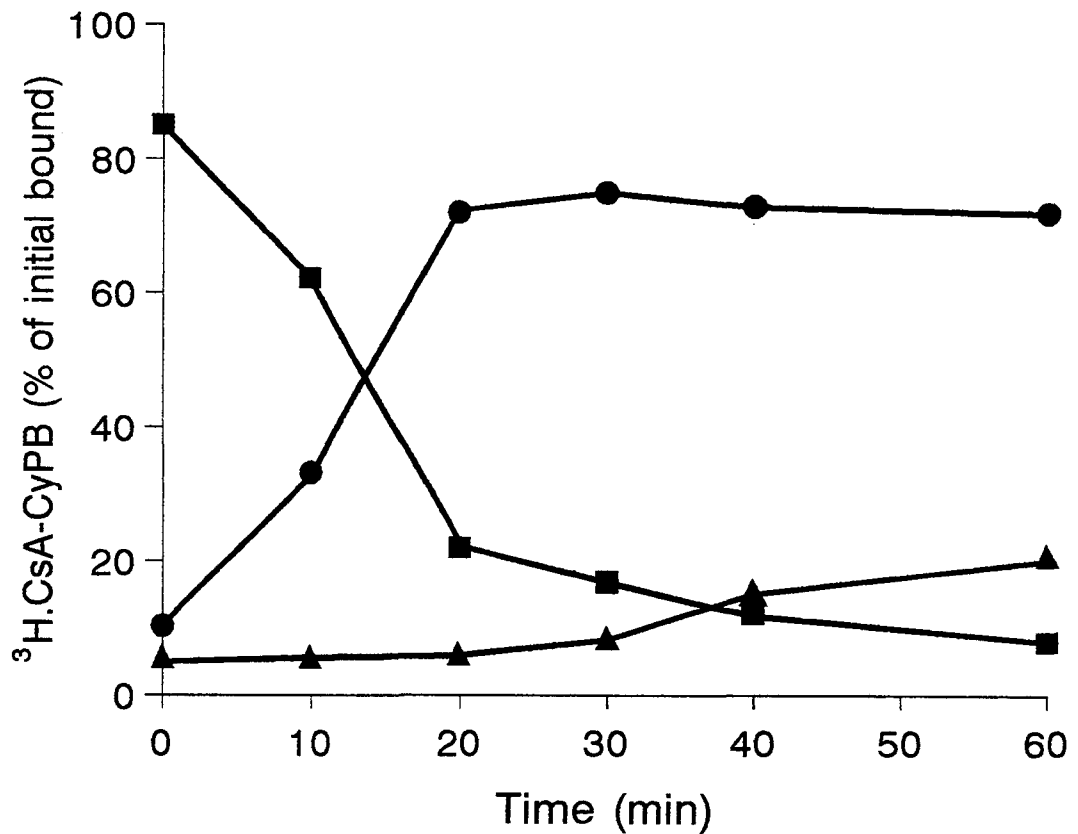


Fig.2. Time-course of the fate of CsA/CyPB surface-bound to human peripheral blood T- lymphocytes. Cells were first incubated with 50 nM of ³H-CsA/CyPB for 1 h at 4°C. After washing off the unbound ligand, cells were allowed to internalize the complex at 37°C. At indicated times, aliquots were removed and incubation supernatant, eluate from mild-acid treated cells and cell pellet radioactivities were counted. Ordinates represent the percentages of the total radioactivity initially bound to T-lymphocytes which was segregated within the cell (●), still surface-bound (■), and released in the incubation medium (▲).

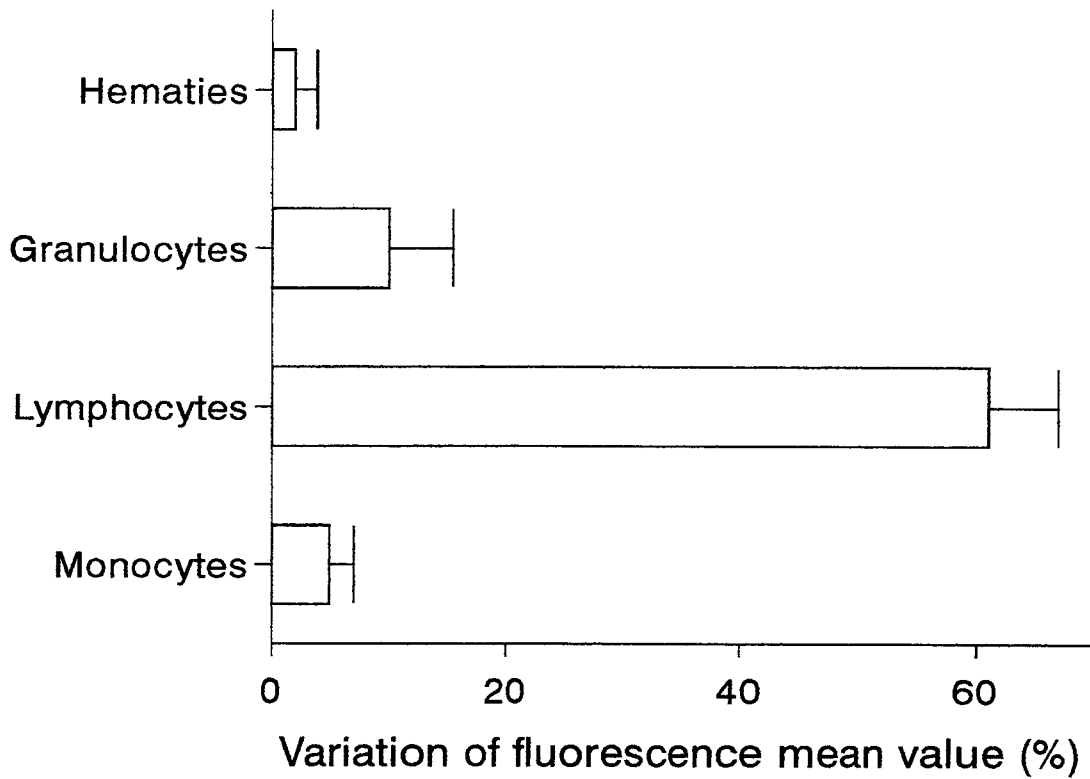


Fig.3. Surface binding of CyPB to human blood cells. Blood cells were fractionated in hematie, monocyte, lymphocyte and granulocyte populations, and CyPB binding was quantified using a polyclonal anti-CyPB antibody. Data were expressed as variations of fluorescence mean values \pm S.D. from flow cytofluorimetry analysis.

Kinetics of Both Free and CyPB-Complexed CsA Uptake by PBMC in Mixed Blood Cell Samples - We studied CyPB influence on the kinetic of CsA-incorporation within PBMC, by incubating blood samples in presence of 25 nM of either uncomplexed or CyPB-complexed ^3H -CsA at 37°C. At various times, aliquots were removed and the PBMC-associated radioactivity was counted (Fig.4). Uncomplexed CsA was rapidly incorporated in cells reaching a plateau after 20 min of incubation, that is not surprising since it is wellknown to easily diffuse in a non-specific manner. In contrast, the CyPB-mediated incorporation of the drug was slower. Nevertheless, the PBMC-associated radioactivity was similar in both cases after 40 min. These results suggest that the internalization process of CsA/ CyPB might be a limitant step for drug incorporation, but that CyPB did not prevent CsA from entering the cells.

Effect of CyPB on CsA incorporation within PBMC - The influence of CyPB on an eventual targeting of CsA towards lymphocytes was then investigated. Various concentrations of free- and CyPB-complexed ^3H -CsA were incubated with either purified PBMC or whole blood, and the PBMC-associated radioactivity was counted thereafter. In the first case, cells incorporated CsA in a linear manner, corresponding to almost 25 % of the initially added drug. In contrast, the CyPB-mediated incorporation is lower and saturable (Fig.5A). These results are not surprising since CsA saturation occurs at higher concentrations in PBMC, but in presence of CyPB, the incorporation of the drug is limited by the saturable binding of the protein. In the case of mixed blood cell samples, the incorporation of free CsA in PBMC was also linear, but in a lower ratio in comparison with pre-isolated cells. Only 10% of the radioactivity was recovered in the PBMC fraction, that is normal considering the non-specific partition of the drug through the lipid bilayer of other cells. In contrast, the CyPB-complexed CsA incorporation was very similar to the one observed in pre-isolated PBMC, implying a specific targeting of the complex through its surface binding on T-cell membrane (Fig.5B).). Moreover, low concentrations of CyPB, below the saturation of surface binding site capacity, promoted an increase of drug uptake in comparison with free CsA (+ 40% for 16 nM of CsA/CyPB). These results demonstrate that in presence of other blood cells, CyPB targeted CsA and promoted its incorporation into T-cells, leading to an increase of CsA uptake. In contrast, CyPB concentrations higher than the K_d mean value of surface binding diminished the drug uptake in comparison with free CsA, suggesting the saturation of surface binding site capacity is a limitant step for CyPB-mediated CsA incorporation.

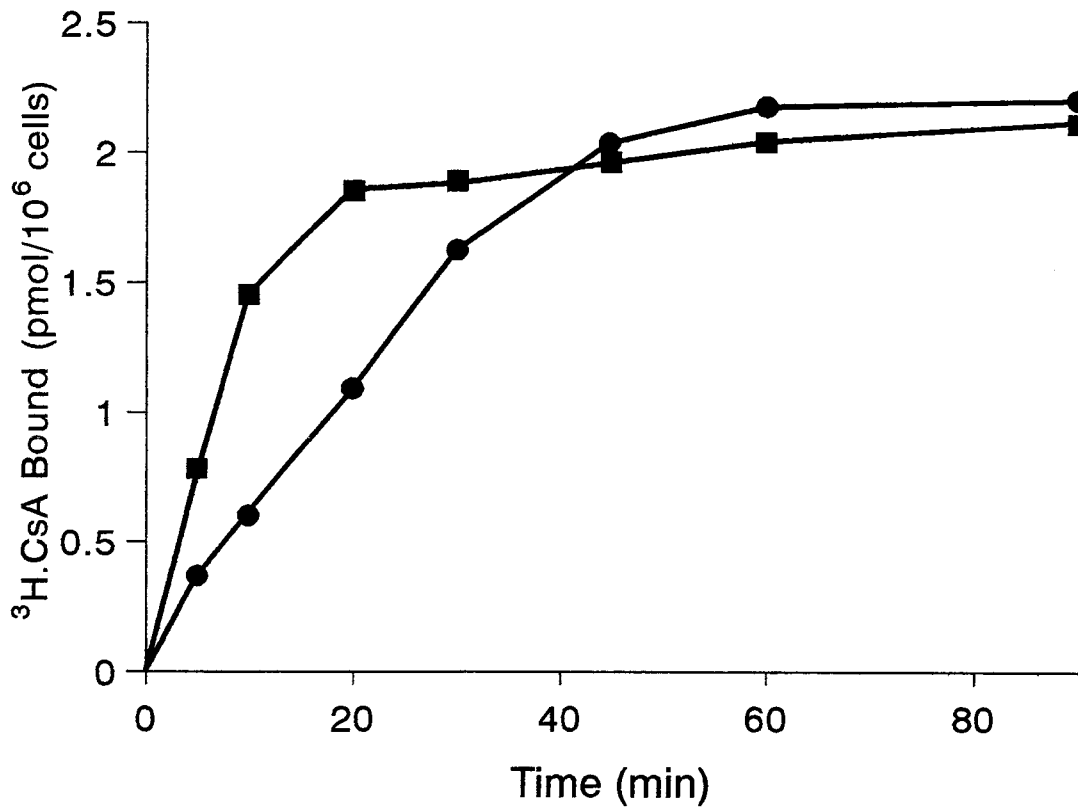


Fig.4. Time-course of both free and CyPB-complexed CsA uptake by PBMC in mixed-blood cell samples. Blood cells were incubated with 25 nM of either $^3\text{H-CsA}$ (■) or $^3\text{H-CsA/CyPB}$ (●) for 1 h at 37°C. At the indicated times, PBMC were harvested by gradient centrifugation, washed extensively, and cell-associated radioactivity was counted.

Effect of CyPB on CsA distribution - We then investigated the distribution of CyPB-complexed CsA and free CsA between blood cells and supernatants. No significant variation was observed in the radioactivity distribution between supernatant, erythrocyte and PBMC contents for free CsA concentrations ranging from 5 to 250 nM (Fig. 6A). Low CsA level was obtained in supernatant, but this phenomenon is likely to be due to the replacement of plasma by RPMI medium, since plasma lipoproteins are known to accumulate high concentrations of the drug. These results are in agreement with the published data : the distribution between red blood cells and plasma becomes non linear at higher concentrations than 750 nM ; PBMC, however, do not become saturated at CsA concentration up to 6 μ M (23). In contrast, CyPB addition rapidly disturbed the equilibrium between erythrocytes, supernatant and PBMC (Fig. 6B). Supernatant-associated radioactivity rapidly increased with CyPB concentrations, as erythrocyte-associated radioactivity consequently decreased. Cell-associated radioactivity was also found in erythrocyte content even in presence of CyPB, suggesting the drug might diffuse into cell beside its specific targeting to T-cells. Indeed, we have shown that erythrocytes did not express surface binding sites for CyPB, implying the complex did not internalize within these cells. The fact that CsA was recovered in erythrocyte content suggest the drug could dissociate from CyPB and entered the cells through a non specific way. Nevertheless, the equilibrium between erythrocyte content and supernatant rapidly reversed with CyPB concentration increase, suggesting high concentration of the protein retained the drug in a soluble complexed form. The diffusion of the drug seems to be dependent of an equilibrium between extracellular CyPB and intracellular CsA receptors, and concentrations higher than 100 nM were in favor of the retention of a circulating form of complexed drug. Taken together, these results suggest that CyPB-complexed CsA could enter blood cells through a simple exchange between extracellular CyPB and putative intracellular CsA receptors, and additionally for T-lymphocytes through the specific binding of the complex on cell surface sites.

Immunosuppressive activity of CyPB-complexed CsA - In the next experiments, we intended to compare the immunosuppressive activity of CyPB-complexed CsA with that of free CsA. The two concentrations, 25 and 250 nM, were studied as they correspond to notable increase of CsA incorporation in PBMC content and to large retention of the drug within the supernatant, respectively. Indeed, the internalization of CyPB/CsA might lead to

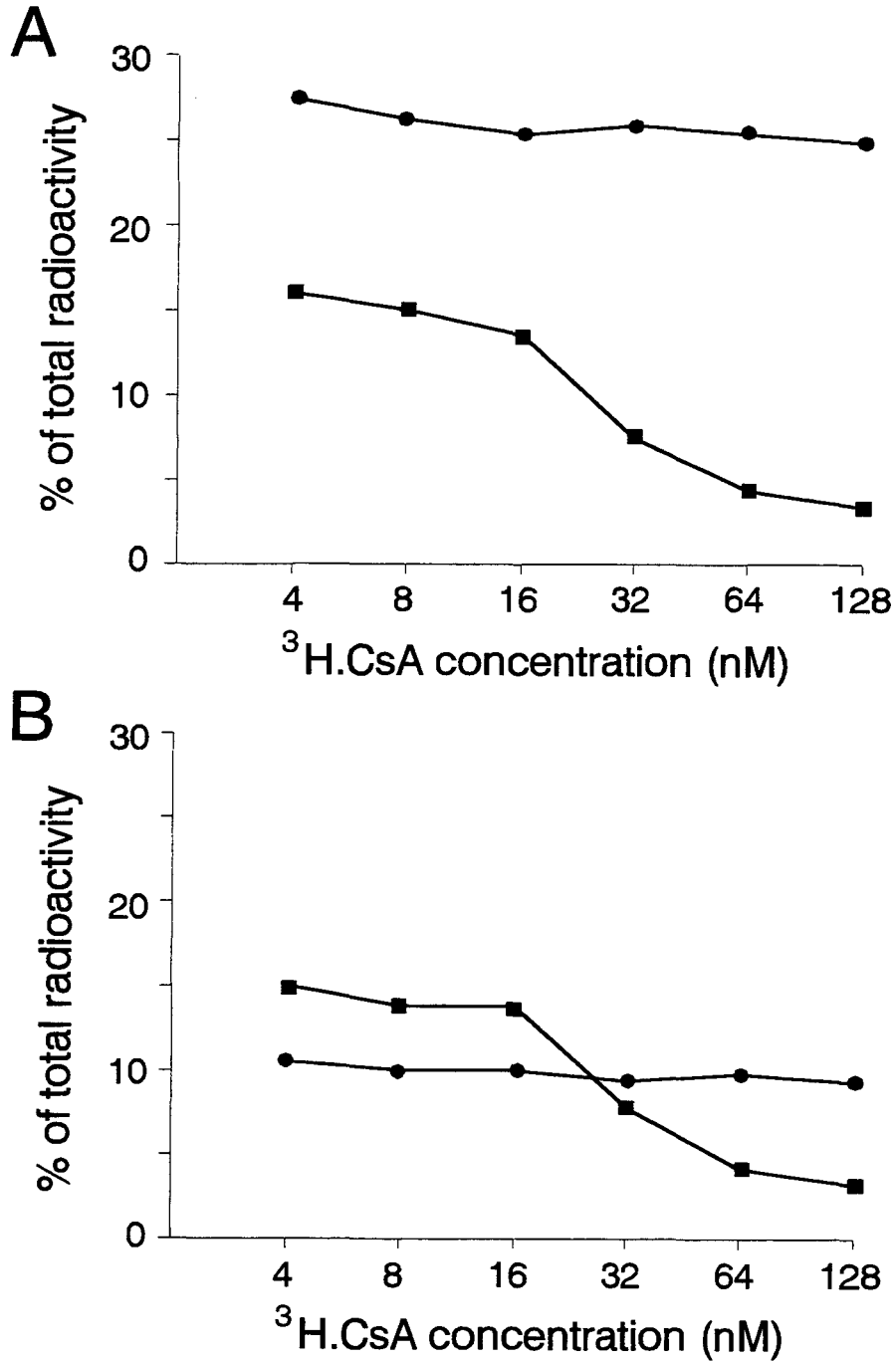


Fig.5. Effect of CyPB on CsA incorporation in PBMC. Both pre-isolated PBMC (A) and mixed blood cells (B) were incubated in presence of either free (●) or CyPB-complexed $^3\text{H.CsA}$ (■) at concentrations ranging in the CyPB surface binding activity. After 1 h-incubation at 37°C , PBMC were harvested and cell-associated radioactivity was counted. Data represent mean values \pm S.D. from three separate experiments.

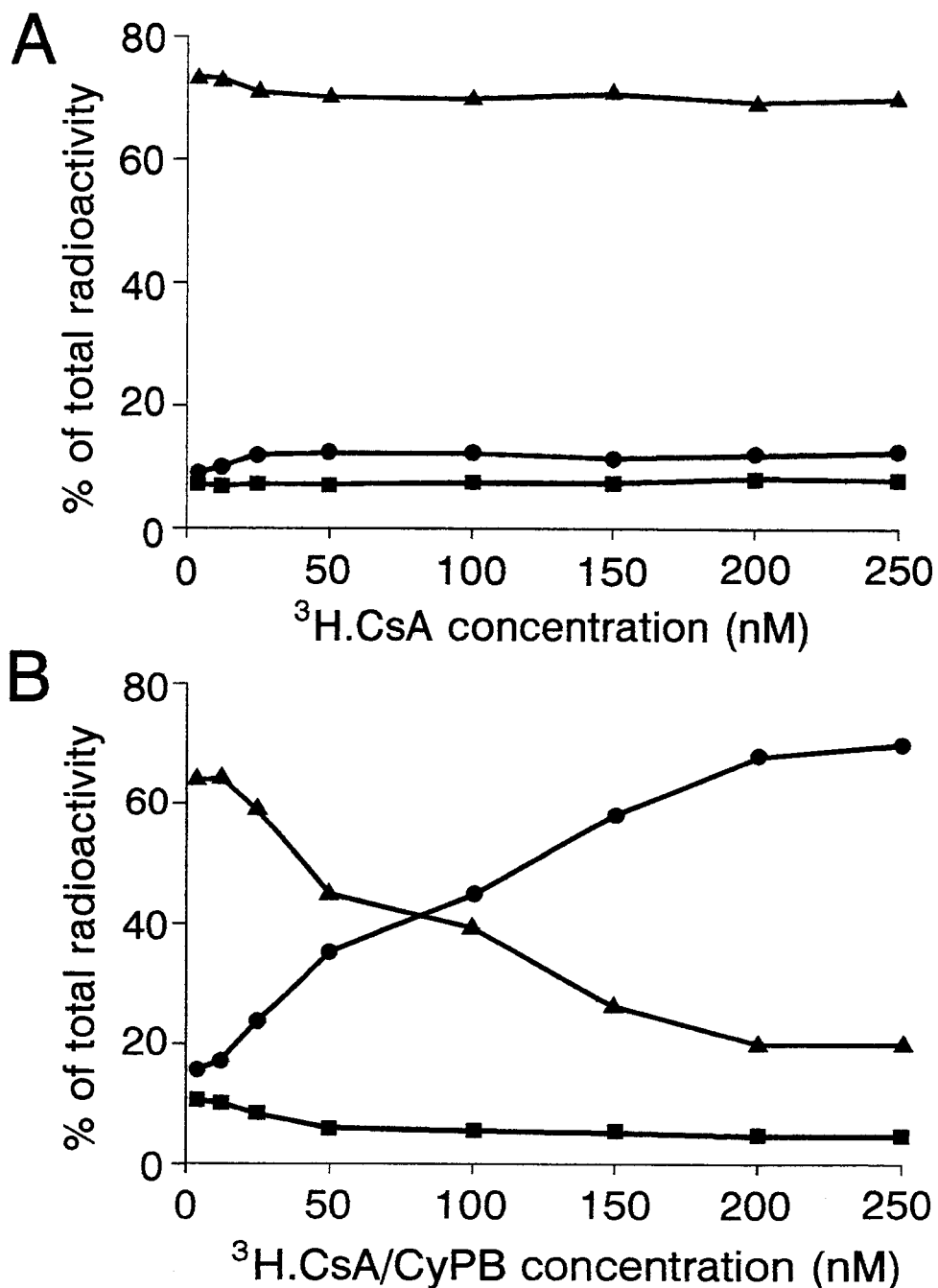


Fig.6. Effect of CyPB on CsA distribution in blood compartments. Blood cell samples were incubated in presence of either uncomplexed (A) or CyPB-complexed $^3\text{H-CsA}$ (B) at various concentrations for 1 h at 37°C . Blood samples were extensively fractionated and radioactivity associated with supernatant (●), hematie (▲) and PBMC (■) contents was counted. Data were expressed as the percentages of distributed $^3\text{H-CsA}$ from the initially added radioactivity. Points represent the mean values from three separate experiments.

the sequestration of the drug in a subcellular compartment without any possibility to exhibit its immunosuppressive activity. The effects of both CyPB-complexed CsA and free CsA on the anti-CD3 mixed-lymphocyte reaction were then compared. Lymphocyte activation was visualized by the inducible IL-2 receptor subunit CD25 expression, using flow cytometry. CyPB-complexed CsA inhibited the CD25 expression to the same extent as free CsA, without any significant variation (Fig. 7A). No significant effect was observed in presence of uncomplexed CyPB, demonstrating the protein had no inhibitory properties on the CD3-activation of T-lymphocytes. Cytogram analysis of lymphocytes population shifting from the resting T-cell region to the activated one allowed us to determine an index of activation, with similar conclusions (data not shown). Cell proliferation was then studied by ³H-thymidine incorporation experiments. As shown in Fig. 7B, results were very similar for both free and CyPB-complexed CsA concentrations, suggesting the CyPB-complexed CsA exhibits anti-proliferative properties to the same extent as free CsA. Moreover, the immunosuppressive effect of the CsA/CyPB complex is unlikely to be due to the diffusion of uncomplexed drug. Indeed, CyPB-complexed drug was more efficient at 250 nM to inhibit the anti-CD3 activation and proliferation of T-cells, even though we have shown that such high level of CyPB was in favor of the maintenance of the complexed form. In conclusion, we demonstrated that the internalized CyPB/CsA complex is still efficient for immunosuppression, suggesting the drug and its receptor dissociate and go on two separate ways into the cell.

DISCUSSION

Our previous work demonstrated that CyPB specifically bound on human lymphoblastic T-cell surface (16). At 37°C, the protein was internalized and subsequently degraded into the cell. Here we present new results on the binding properties of CyPB/CsA complex on human blood T-lymphocytes. As expected, CyPB/CsA complex bound to blood T-cells in a specific manner, to the same extent as free CyPB. The complex was internalized, but contrary to the protein, the drug accumulated within the cells and was still efficient for immunosuppression. Low levels of CyPB, ranging in the binding activity concentrations of the protein, targeted the drug to lymphocytes and consequently increased its intracellular concentration, as compared to free CsA. Nevertheless, CyPB-complexed CsA was found to still enter other blood cells, especially erythrocytes. On the other hand, high CyPB levels

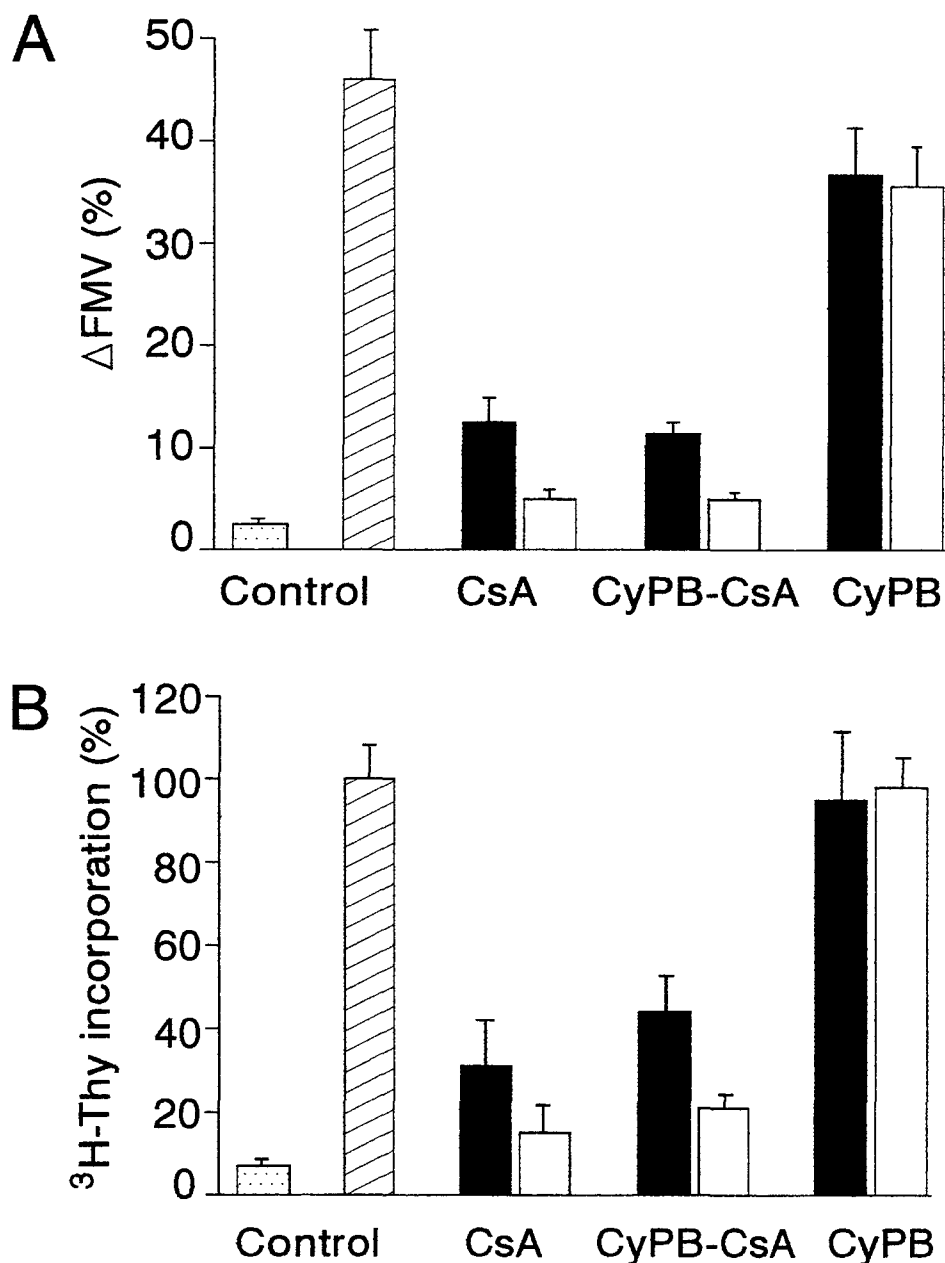


Fig.7. Effect of CyPB on CsA immunosuppressive activity. PBMC were stimulated for 72 h by a monoclonal anti-CD3 antibody, in presence of either CsA, CsA/CyPB complex or CyPB at 25 nM (*close bar*) or 250 nM (*open bar*). T-cell activation and proliferation were visualized by variation of fluorescence mean value (Δ FMV) associated with CD25 expression (A) and by 3 H-thymidine incorporation experiments (B), respectively, as described under "Experimental Procedures". Controls were obtained in the absence of the immunosuppressive drug : unstimulated cells (*dotted bar*), CD3-stimulated cells (*hatched bar*). Data are mean values \pm S.D. from three separate representative experiments.

promoted retention of the drug in the extracellular space, possibly leading to the formation of a soluble pool of circulating CsA.

CyPB data are often divergent and poorly documented in literature, in contrast to the well-studied abundant CyPA. For instance, subcellular CyPB localization is debated. Arber et al. (18) suggest the protein colocalizes with calreticulin in some intracellular vesicles they called calciosomes. They have demonstrated that the protein is retained into these vesicles through its specific C-terminal extension. However, we have reported its characterization in human biological fluids, by using purification procedures and ELISA assays (19, 20). In the same way, Price et al. (24) suggest it may act as a chaperone and escort the neosynthesized proteins along the sorting pathway. They also found it on cell surface and released in the medium with a secretion half-time of 3 h. On the other hand, the role of CyPB in CsA-action is unknown. CsA is supposed to mediate its immunosuppressive action by forming a complex with intracellular cyclophilins, and altering the activity of the Ca^{2+} -dependent phosphatase calcineurin (8-10). The inhibition of the activity of this key enzyme in T-cell activation leads to the block of the cytosolic NF-AT subunit dephosphorylation, preventing its translocation into the nucleus and the inducibility of interleukin-2 gene transcription. Due to its intravesicular localization, CyPB is unlikely to interact with this process. An indirect role has been proposed, in relation with the relative concentration of both CyPA and CyPB in cellular content. Thus, Foxwell et al. (25) have suggested the CsA-resistance of the fibroblastic cell line MRC5 to be due to the higher level of CyPB than CyPA. This hypothesis is in agreement with our selective ELISA assay measurements, which showed that lymphocytes exhibit very low concentration of CyPB versus CyPA (20). Otherwise, recent studies suggest a direct role of CyPB in mediated immunosuppression (26). In fact, by using the two-hybrid system in the yeast, the authors have cloned and expressed a putative receptor for CyPB. This reticulum membrane protein, called CaML for "Calcium-signal modulating cyclophilin ligand", would be involved in the modulation of Ca^{2+} transduction pathway. By binding to CyPB, CsA might block the activity of CAML, leading to a possibly new mechanism of immunosuppression. Our results, however, suggest another alternative. Extracellular CyPB might indirectly interact in the immunosuppression mechanisms, through the specific targeting of the drug to sensitive cells.

CyPB surface binding sites would be related to at least three functions, according to the data of the literature and our own experiments. We showed that CyPB binding sites were endocytosed in presence of the ligand and recycled in the Jurkat T-cell line, as

indicated by its reexpression on the cell surface even in presence of cycloheximide (unpublished results). As Price et al. (24) suggested CyPB could act as a chaperone, the binding sites might be recycling receptors involved in the return of CyPB to the reticulum vesicles. This hypothesis is in agreement with the recent data of Baker et al. (27), who demonstrate the cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone and recycles back and forth within the secretory pathway. The internalization of the immunosuppressive complex might be coupled to the receptor recycling, leading to a long-term action of the drug. Indeed, we have shown that high level of CyPB retained the drug into the extracellular space and prevented its diffusion into erythrocyte content. Thus, CsA might continually accumulates within the T-cell content. A second function might be as a scavenger receptor for released CyPB. Besides a targeting of the drug to lymphocytes, the CyPB binding sites might be associated with toxicity of CsA therapy. They may occur on liver and kidney cell surface, leading to a damaging accumulation of the drug in the tissues. The third function of CyPB binding sites might be related to chemotactic activity of cyclophilins (28,29). The formation of the CyPB/CsA complex would lead to the block of a chemokin-like activity and CsA might consequently act by inhibiting lymphocyte migration to the inflammation site. This last point is intriguing as it could in part explain the anti-inflammatory effect of CsA in psoriasis disease, where it was shown the drug depletes both activated and non-activated T cells from the epidermis and dermis of psoriatic patients (30).

In summary, we have shown that CyPB promotes the incorporation of CsA into blood T-lymphocytes through the specific binding of the complex to cell membrane. Thus, the targeting of the drug and its consequently increase in cell content might be related to the susceptibility of T-lymphocytes. Nevertheless, the CyPB binding site functions need to be further investigated, in an attempt to provide more explanations for the variability of CsA sensitivity and toxicity in CsA therapy.

Acknowledgements - We are grateful to Dr. L. Vernillet for the generous gift of tritiated CsA derivative, to Dr. M. Zurini and Dr. N.R. Movva for the pCGF-72 plasmid, to Dr. D. Brevière for blood samples, and to P. Michaux, J.P. Dumon and M. Binchet for their assistance in the production of recombinant CyPB.

REFERENCES

1. Haendler, B., Hofer-Warbinek, R., and Hofer, E. (1987) *EMBO. J.* **6**, 947-950
2. Price, E.R., Zydowsky, L.D., Jin, M., Baker, C.H., McKeon, F.D., and Walsh, C.T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1903-1907
3. Bergsma, D.J., Eder, C., Gross, M., Kersten, H., Sylvester, D., Appelbaum, E., Cusimano, D., Livi, G.P., McLaughlin, M.M., Kasyan, K., Porter, T.G., Silverman, C., Dunnington, D., Hand, A., Prichett, W.P., Bossard, M.J., Brandt, M., and Levy, M.A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23204-23214
4. Schneider, H., Charara, N., Schmitz, R., Wehrli, S., Mikol, V., Zurini, M.G.M., Quesniaux, V.F.J., and Movva, N.R. (1994) *Biochemistry* **33**, 8218-8224
5. Kieffer, L.J., Seng, T.W., Li, W., Osterman, D.G., Handschumacher, R.E., and Bayney, R.M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12303-
6. Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F.X. (1989) *Nature* **337**, 476-478
7. Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. (1989) *Nature* **337**, 473-475
8. Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S.L. (1991) *Cell* **66**, 807-815
9. Liu, J., Albers, M.W., Wandless, T.J., Luan, S., Alberg, D.G., Belshaw, P.J., Cohen, P., McKintosh, C., Klee, C.B., and Schreiber, S.L. (1992) *Biochemistry* **31**, 3896-3901
10. Schreiber, S.L., (1992) *Cell* **70**, 365-368
11. Sander, B., Brigati, C., and Möller, E. (1986) *Scand. J. Immunol.* **23**, 435-440
12. Povlsen, J.V., Rasmussen, A., Madsen, M., and Lamm, L.U. (1990) *Scand. J. Immunol.* **32**, 45-51
13. Masy, E., Labalette-Houache, M., and Dessaint, J.P. (1994) *Therapie* **50**, 271-277
14. Legrue, S.J., Friedman, A.W., and Kahen, B.D. (1983) *Transplant. Proc.* **15**, 2259-2264
15. Cacalano, N.A., Chen, B.X., Cleveland, W.L., and Erlanger, B.F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4353-4357
16. Allain, F., Denys, A., and Spik, G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16537- 16540
17. Hasel, K.W., Glass, J.R., Godbout, M., and Sutcliffe, J.G. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3484-3491
18. Arber, S., Krause, K.H., and Caroni, P. (1992) *J. Cell. Biol.* **116**, 113-125

19. Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H., Keller, R., Hiestand, P.C., and Movva, N.R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10735-10738
20. Allain, F., Boutillon, C., Mariller, C., and Spik, G. (1995) *J. Immunol. Meth.* **178**, 113-120
21. Julius, M.H., Simpson, E., and Herzenberg, L.A. (1973) *Eur. J. Immunol.* **3**, 645-649
22. Böyum, A. (1968) *Scand. J. Clin. Invest.* **21**, 77-89
23. Lindhom, A. (1991) *Ther. Drug Monit.* **13**, 465-477
24. Price, E.R., Jin, M., Lim, D., Pati, S., Walsh, C.T., and McKeon, F.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3931-3935
25. Foxwell, B.M.J., Woerly, G., Husi, H., Mackie, A., Quesniaux, V.F.J., Hiestand, P.C., Wenger, R.M., and Ryffel, B. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 115-121
26. Bram, R.J., and Crabtree, G.R. (1994) *Nature* **371**, 355-358
27. Baker, E.K., Colley, N.J., and Zuker, C.S. (1994) *EMBO J.* **13**, 4886-4895.
28. Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A., and Cerami, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3511-3515
29. Xu, Q., Leiva, M.C., Fischkoff, S.A., Handschumacher, R.E., and Lyttle, C.R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11968-11971
30. Gupta, A.K., Baadsgaard, O., Ellis, C.N., Voorhees, J.J., and Cooper, K.D. (1989) *Arch. Dermatol. Res.* **281**, 219-226.

*This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n°111 ; Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires ; Director : Prof. A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille and by grants from the European Economic Community (Biomed Program Contract n° BMH1-CT93-1748).

¹ The abbreviations used are : CsA, cyclosporin A; CyPA, cyclophilin A; CyPB, cyclophilin B; DPBS, Dulbecco's phosphate buffered saline; BSA, bovine serum albumin; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

III. Conclusion

Les travaux réalisés à l'aide de CyPB radiomarquée et de CsA tritiée et complexée à la CyPB nous ont permis de montrer que la protéine et le complexe se fixaient de manière équivalente à la surface des lymphocytes T circulants, démontrant que le médicament ne modifie pas les interactions entre la CyPB et son récepteur lymphocytaire. A 37°C, le complexe CyPB/CsA est endocyté, mais contrairement à la protéine qui est dégradée dans la cellule, l'immunosuppresseur s'accumule dans la cellule et conserve son activité.

Les études comparées d'incorporation de la CsA et du complexe CyPB/CsA nous ont permis de mettre en évidence un ciblage préférentiel du médicament vers les lymphocytes. Cependant, ce phénomène n'est observable que pour des concentrations inférieures ou égales à la capacité de fixation des lymphocytes, confirmant l'intervention du récepteur de la CyPB dans le ciblage et l'incorporation du médicament complexé.

La propriété de ciblage de la CyPB suggère que cette protéine peut intervenir dans la sélectivité d'action de la CsA pour les lymphocytes T, seules cellules circulantes exprimant une densité importante de récepteurs de surface pour le complexe CyPB/CsA.

Les dosages de CyPB dans le plasma nous avaient permis de montrer que la protéine était présente dans ce milieu à des concentrations variables. Ces résultats suggèrent que le taux circulant de complexe CyPB/CsA est variable d'un individu à l'autre. Ainsi, l'incorporation de la CsA dans les lymphocytes peut être modifiée en fonction du taux de complexe, et être à l'origine de variations de sensibilité.

Ces derniers travaux sont en faveur d'un rôle important de la CyPB dans la susceptibilité lymphocytaire à l'immunosuppression. La poursuite de ces études devraient permettre de comprendre le rôle de cette protéine dans les mécanismes d'action de la CsA et de mieux contrôler ainsi les phénomènes de variabilité de sensibilité au traitement immunosuppresseur.

Conclusion générale

En transplantation d'organes, la sensibilité au traitement immunosuppresseur est un facteur crucial pour le maintien de la greffe. En effet, une importante variabilité a été démontrée dans la réponse lymphocytaire au traitement à la CsA. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la susceptibilité cellulaire à cet immunosuppresseur est indispensable pour optimiser les thérapies de prévention de rejet de greffe et de traitement de maladies autoimmunes.

Comme nous l'avons souligné dans le chapitre sur l'immunité de greffe, de nombreux facteurs peuvent être impliqués dans les mécanismes d'action de la CsA, et être à l'origine de phénomènes de variabilité de réponse cellulaire au traitement. Une des voies de recherche intéressante concerne la compréhension des rôles des cyclophilines dans la médiation de l'activité du médicament.

La CyPA est l'isoforme la plus abondante de cette famille de protéines et son rôle direct dans l'immunosuppression semble évident. En effet, il s'agit de la cible principale de la CsA, et sa co-localisation cytosolique avec la calcineurine permet au complexe CyPA/CsA d'interagir physiquement avec cette phosphatase. Or, il est maintenant bien établi que c'est l'inhibition de l'activité enzymatique de la calcineurine qui est à l'origine du blocage de la transcription des gènes indispensables à l'activation des lymphocytes T. Par contre, il semble peu probable que la CyPA seule soit directement liée aux variations de sensibilité cellulaire à la CsA. En effet, elle est abondamment représentée dans toutes les cellules de l'organisme, et seule une fraction mineure est effectivement complexée au médicament et impliquée dans la médiation de son activité immunosuppressive.

La CyPB est la seconde cyclophiline la mieux représentée dans les différents tissus. Elle est exprimée dans les cellules à un taux plus faible que la CyPA et serait présente dans les vésicules intracellulaires et la voie de sécrétion. Sa localisation non cytosolique ne lui permet pas d'agir directement avec la calcineurine. Toutefois, elle est susceptible d'intervenir à plusieurs niveaux dans la susceptibilité cellulaire à la CsA. En se complexant au médicament, elle pourrait provoquer son accumulation dans les vésicules intracellulaires et empêcher ainsi la formation du complexe immunosuppresseur avec la CyPA. La distribution relative des deux isoformes pourrait donc influencer la sensibilité cellulaire à la CsA, par un partage de l'immunosuppresseur entre les compartiments cytosoliques et intramembranaires. Les travaux antérieurs effectués au Laboratoire ont permis de caractériser la CyPB dans le lait humain (Spik *et al.*, 1991). Sa présence dans ce liquide biologique suggère que la protéine peut être sécrétée et retrouvée dans d'autres milieux

extracellulaires. Elle pourrait alors interagir avec la CsA et modifier l'incorporation du médicament dans les cellules.

Afin de conforter ces hypothèses, il nous a semblé intéressant d'étudier la distribution relative de la CyPA et de la CyPB dans les différents compartiments du sang et d'analyser plus précisément le rôle de la CyPB dans l'incorporation de la CsA dans les cellules sensibles.

La CyPA et la CyPB possédant 60 % d'homologie de séquence, les anticorps dirigés contre les protéines entières n'étaient pas utilisables pour discriminer les deux protéines en raison de réactions croisées inévitables. Il nous a donc fallu mettre au point une méthode capable de doser sélectivement les deux isoformes dans des échantillons où elles se trouvaient en mélange. Nous avons choisi de produire des anticorps dirigés contre des peptides synthétiques copiant les régions les plus divergentes des deux protéines, ce qui nous a permis de développer une méthode de dosage ELISA. Les techniques décrites dans la littérature reposaient sur la propriété des cyclophilines à se fixer à un dérivé de CsA immobilisée (Quesniaux *et al.*, 1987 ; Ryffel *et al.*, 1991). Elles n'étaient donc pas utilisables pour étudier les échantillons de sang d'individus greffés. Notre méthode étant basée sur la reconnaissance spécifique de peptides C-terminaux, et donc éloignés du site catalytique de ces protéines, elle pourra être utilisée pour mesurer les concentrations des deux cyclophilines en présence de CsA et étudier par la suite leur distribution relative dans les cellules d'individus greffés.

Les études qualitatives avaient permis de montrer que la CyPB et son ARNm étaient présents dans tous les tissus étudiés à un taux plus faible que celui de la CyPA (Bergsma *et al.*, 1991 ; Foxwell *et al.*, 1992). Cependant, aucune méthode n'avait permis de quantifier la protéine dans les extraits cellulaires. Notre dosage nous a permis de mesurer les concentrations de CyPB dans les leucocytes du sang à un taux moyen de 250 ng/mg de protéines, et de confirmer que la CyPA est présente dans les mêmes cellules à un taux dix fois plus élevé. De plus, la concentration en CyPA est sensiblement équivalente dans les différents leucocytes, alors que la CyPB est moins abondante dans les lymphocytes, cellules particulièrement sensibles à la CsA. Des études préalables d'immunorévélation avaient permis de montrer que la CyPB était largement représentée dans une lignée fibroblastique résistante à la CsA, alors qu'elle était très minoritaire devant la CyPA dans les lymphocytes

(Foxwell *et al.*, 1992). Nous avons également montré que la concentration en CyPB dans les différents leucocytes est étroitement corrélée chez un même individu, mais qu'il n'existe pas de relation entre les taux de CyPA et de CyPB. Ces résultats suggèrent que l'expression des deux cyclophilines est indépendante, et que leur distribution relative est susceptible de varier selon la nature de la cellule, mais également d'un individu à l'autre. Ainsi, la proportion de CyPA et de CyPB pourrait influencer la distribution subcellulaire de la CsA, et intervenir par conséquent dans la sélectivité d'action du médicament et dans la variabilité inter-individuelle de sensibilité.

Quelques articles mentionnent la présence de cyclophilines dans les milieux extracellulaires, mais seuls les travaux de Spik *et al.*, (1991) ont permis de caractériser une isoforme dans le lait de Femme et de l'identifier à la CyPB. Nous avons alors recherché cette protéine dans le plasma humain, et montré qu'elle était présente dans ce liquide biologique à une concentration moyenne de 150 ng/ml. Par contre, aucune trace de CyPA n'a pu être détectée.

La CyPB plasmatique pourrait intervenir au moins à deux niveaux dans les mécanismes d'action de la CsA. Sherry *et al.* (1992) et Xu *et al.* (1992) ont caractérisé une activité chimiotactile associée à des cyclophilines sécrétées, tandis que Caroni *et al.* (1991) mentionnent une activité facteur de croissance. La CyPB pourrait agir comme une cytokine et contrôler certaines étapes de l'activation du système immunitaire ou intervenir plus généralement dans des processus inflammatoires. Il est probable que la fixation de CsA bloquerait ces activités, conduisant à une voie parallèle d'inhibition de la réponse immune. La CyPB pourrait également modifier la distribution du médicament dans le sang. En effet, elle pourrait soit piéger la CsA avant qu'elle ne pénètre dans les cellules, et provoquer son élimination de la circulation, soit favoriser son incorporation dans certaines cellules du sang par l'intermédiaire d'un récepteur du complexe CyPB/CsA. Nous nous sommes donc intéressés dans la suite de nos travaux à l'étude des interactions entre la CyPB et les cellules du sang.

Nous avons recherché la présence d'un récepteur de la CyPB à la surface des cellules du sang et issues de lignées lymphoblastiques. Nous avons ainsi caractérisé une fixation spécifique, saturable et réversible sur les lymphocytes T circulants et sur les cellules de lignées T. L'utilisation de CyPB radiomarquée nous a permis de montrer que la protéine se fixe à la surface des cellules de la lignée T Jurkat avec un Kd de 12 nM, pour un

nombre de sites moyen de 35000 par cellule, et à la surface des lymphocytes T circulants avec un Kd de 18 nM, pour un nombre de sites de 38000 par cellule. Par contre, aucune fixation similaire n'a été observée à la surface des autres cellules du sang.

Sur la base de ces résultats, nous avons choisi comme modèle cellulaire la lignée T Jurkat pour étudier le devenir de la CyPB après fixation membranaire. La protéine est endocytée à 37°C, puis relarguée dans le milieu extracellulaire sous une forme dégradée. L'internalisation est dépendante de la température et maximale entre 20 et 30 minutes, alors que la protéine dégradée apparaît plus tardivement dans le surnageant. Ces résultats sont en faveur d'une endocytose de la CyPB par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire spécifique. La CsA n'inhibe pas le processus d'internalisation, suggérant que le complexe CyPB/CsA peut être incorporé dans la cellule par l'intermédiaire du récepteur membranaire de la CyPB.

De nombreux articles mentionnent des interactions entre des cyclophilines et d'autres protéines, le plus souvent inhibées en présence de CsA. Cependant, ni la CyPA, ni la CsA n'inhibent la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T. Ces résultats suggèrent que le site d'interaction de la CyPB avec son récepteur membranaire n'implique pas le site catalytique de la protéine et n'est pas localisé dans une région homologue avec les autres cyclophilines. La CyPB est connue pour être retenue dans les vésicules du réticulum endoplasmique par son extrémité C-terminale spécifique (Arber *et al.*, 1991). Un récepteur spécifique de cette isoforme a même été récemment caractérisé dans les membranes intracellulaires et serait impliqué dans la régulation du flux calcique (Bram & Crabtree, 1994). De tels sites de fixation pourraient être exprimés à la surface des cellules T et intervenir dans la fixation de la CyPB plasmatique. Ces différents résultats seraient en faveur d'un rôle spécifique de la CyPB à travers sa fixation à la surface des lymphocytes T.

Nous avons ensuite comparé les fixations du complexe CyPB/CsA et de la CyPB seule à la surface des cellules T. L'utilisation de CsA tritiée nous a permis de montrer que le complexe se fixait avec une affinité proche de celle de la protéine seule, et avec un nombre de sites équivalent. Ces résultats suggérant que CyPB/CsA et CyPB se fixent sur des sites membranaires identiques, nous avons étudié l'influence de la protéine sur l'incorporation du médicament dans les lymphocytes T circulants.

Nous avons ainsi montré que le complexe CyPB/CsA était endocyté à 37°C, mais contrairement à la protéine, la CsA n'est pas relarguée dans le milieu extracellulaire et s'accumule dans le lymphocyte T, suggérant que CyPB et CsA suivent des voies différentes

dans la cellule. De plus, le médicament reste encore actif pour inhiber l'activation des lymphocytes T, démontrant qu'il n'est pas séquestré dans un compartiment subcellulaire où il ne pourrait plus exercer son activité immunosuppressive.

Enfin, nous avons étudié l'influence de la CyPB sur la distribution de la CsA dans les différents compartiments du sang. L'internalisation du complexe est un facteur limitant pour l'incorporation du médicament dans les cellules du sang. En effet, les concentrations faibles en CyPB, inférieures ou égales à la capacité de fixation membranaire de la CyPB, privilégient un ciblage de la CsA vers les lymphocytes. Par contre, des concentrations supérieures perturbent la distribution du médicament dans les cellules et favorisent sa rétention dans le surnageant.

La CsA est connue pour diffuser de façon non spécifique dans les cellules du sang, et est majoritairement retrouvée associée aux hématies. De nombreux auteurs ont recherché des récepteurs de CsA à la surface des lymphocytes T, afin d'apporter une explication à la sélectivité d'action du médicament. Nos résultats suggèrent une autre alternative. La CyPB plasmatique pourrait piéger une partie du médicament avant qu'il ne pénètre dans la fraction érythrocytaire. Le complexe formé serait alors spécifiquement ciblé vers les lymphocytes T, seules cellules du sang exprimant un taux élevé de récepteurs pour la CyPB, et la CsA sélectivement incorporée dans ces cellules par l'intermédiaire de l'endocytose du complexe.

Nos travaux ont permis de montrer que la CyPB était présente dans les leucocytes du sang et le plasma à des concentrations variables, qu'elle était capable de se fixer spécifiquement à la surface des lymphocytes T, d'être internalisée dans ces cellules en présence de CsA et de modifier l'incorporation du médicament. Ces résultats confortent l'hypothèse d'un rôle important de la CyPB dans la sélectivité d'action de la CsA et dans la variabilité individuelle de sensibilité à l'immunosuppression.

L'étude sur la distribution et les rôles de la CyPB et de son récepteur membranaire demande à être poursuivie, afin de mieux comprendre l'influence de cette isoforme dans les mécanismes d'action de la CsA.

Les dosages de la CyPA et de la CyPB pourront être réalisés dans des échantillons de sang d'individus greffés et dans les lymphocytes d'individus sains phénotypés pour leur sensibilité à la CsA, afin d'établir d'éventuelles relations avec les variations de sensibilité à l'immunosuppression et l'efficacité du traitement. De même, le taux de CyPB plasmatique

et le niveau d'expression de son récepteur lymphocytaire pourront être étudiés individuellement.

L'influence de la CyPB sur la susceptibilité lymphocytaire à la CsA pourra être étudiée en comparant les effets de la CsA seule et du complexe CyPB/CsA sur l'inhibition *in vitro* de l'activation lymphocytaire mixte, et en analysant l'activité immunosuppressive du complexe *in vivo*.

Les lymphocytes sont représentés dans le sang par de nombreuses sous-populations de sensibilité variable à l'immunosuppression. Il sera donc intéressant d'étudier l'expression du récepteur de la CyPB chez ces différentes sous-classes de lymphocytes, afin de déterminer si sa présence n'est pas liée à une plus grande sensibilité au médicament.

Il sera nécessaire de mieux caractériser le récepteur de la CyPB et d'étudier ses fonctions biologiques. Son clonage pourra être envisagé, ainsi que l'étude des voies de signalisation transmembranaire engagées. Plus généralement, le rôle de la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T devra être éclairci. En effet, l'inhibition éventuelle par la CsA de l'activité membranaire de la CyPB pourrait être à l'origine d'un mécanisme parallèle d'immunosuppression.

Enfin, l'expression du récepteur de la CyPB devra être recherchée à la surface d'autres cellules de l'organisme. En effet, sa présence pourra être impliquée dans des phénomènes de toxicité, par une accumulation massive du médicament par l'intermédiaire de l'internalisation du complexe CyPB/CsA, ou par l'inhibition d'une activité membranaire liée à la fixation de la CyPB.

Ces différentes études devront permettre de comprendre le rôle de la CyPB dans la médiation de l'action immunosuppressive de la CsA et dans les mécanismes de susceptibilité à l'immunosuppression. Leurs applications permettront peut-être d'optimiser l'utilisation de la CsA, de mieux contrôler l'efficacité de l'immunosuppression et d'adapter les traitements à chaque individu.

Bibliographie

- Akbar A.N., Salmon M. and Janossy G.** (1991) The synergy between naïve and memory T-cells during activation. *Immunol. Today* **12**, 184-189.
- Albers M.W., Walsh C.T. and Schreiber S.L.** (1990) Substrate specificity for the human rotamase FKBP : a view of FK506 and rapamycin as leucine-(twisted amide)-proline mimics. *J. Org. Chem.* **55**, 4984-4986.
- Altschuh D., Vix O., Rees B. and Thierry J.C.** (1992) A conformation of cyclosporin-A in aqueous environment revealed by the X-ray structure of a cyclosporine-Fab complex. *Science* **256**, 92-94.
- Amon E.U.** (1992) Cyclosporin A inhibits histamine release from human peripheral basophils and human skin mast cells. *Agents Actions C*, 250-252.
- Anderson S.K., Gallinger S., Roder J., Frey J., Young H.A. and Ortaldo J.R.** (1993) A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 542-546.
- Arber S., Krause K.H. and Caroni P.** (1992) s-Cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J. Cell. Biol.* **116**, 113-125.
- Azhderian E.M., Kolipaka J., Lentz S. and Lorber M.I.** (1993) Nuclear membrane-associated cyclophilins of potential importance in cyclosporine immunosuppression. *Transplant. Proc.* **25**, 524-526.
- Baker E.K., Colley N.J. and Zuker C.S.** (1994) The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex *in vivo* with its protein target rhodopsin. *EMBO J.* **13**, 4886-4895.
- Baldari C.T., Macchia G., Heguy A. Helli M. and Telford J.L.** (1991) Cyclosporin A blocks calcium-dependent pathways of gene activation. *J. Biol. Chem.* **266**, 19103-19108.
- Baldari C.T., Heguy A. and Telford J.L.** (1993) Calcium-dependent cyclosporin A-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by p56^{lck}. *J. Biol. Chem.* **268**, 8406-8409.
- Bang H., Brune K., Nager C. and Feige U.** (1993) Interleukin-8 is a cyclosporin A binding protein. *Experientia* **49**, 533-538.
- Barre J.** (1992) Les formes circulantes de la cyclosporine A. *Therapie* **47**, 301-304.
- Bell K.D., Ramilo O. and Vitetta E.S.** (1993) Combined use of an immunotoxin and cyclosporine to prevent both activated and quiescent peripheral blood T cells from

- producing type I human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 1411-1415.
- Bergsma D.J., Eder C., Gross M., Kersten H., Sylvester D., Appelbaum E., Cusimano D., Livi G.P., McLaughlin M.M., Kasyan K., Porter T.G., Silverman C., Dunnington D., Hand A., Prichett W.P., Bossard M.J., Brandt M. and Levy M.A.** (1991) The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* **266**, 23204-23214.
- Bevan M.J.** (1977) High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol. Today* **5**, 128-133.
- Bierer B.E., Mattila P.S., Standaert R.F., Herzenberg L.A., Burakoff S.J., Crabtree G. and Schreiber S.L.** (1990a) Two distinct signal transmission pathways in T-lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9231-9235.
- Bierer B.E., Somers P.K., Wandless T.J., Burakoff S.J. and Schreiber S.L.** (1990b) Probing immunosuppressant action with a non-natural immunophilin ligand. *Science* **250**, 556-558.
- Bierer B.E., Hollander G., Fruman D.A. and Burakoff S.J.** (1993) Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 763-773.
- Bonnefoy-Berard N., Genestier L., Flacher M. and Revillard J.P.** (1994) The phosphoprotein phosphatase calcineurin controls calcium-dependent apoptosis in B cell lines. *Eur. J. Immunol.* **24**, 325-329.
- Borel J.F., Feurer C., Gubler H.U. and Stähelin H.** (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents & Actions* **6**, 468-475.
- Borel J.F.** (1989) Pharmacology of cyclosporin (Sandimmune). *Pharmacol. Rev.* **42**, 260-372.
- Bose S., Mücke M. and Freedman R.B.** (1994) The characterization of a cyclophilin-type peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase from the endoplasmic-reticulum lumen. *Biochem. J.* **300**, 871-875.
- Brabletz T., Pietrowski I. and Serfling E.** (1991) The immunosuppressives FK506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin-2 enhancer. *Nucleic Acid Res.* **19**, 61-67.
- Bram R.J., Hung D.T., Martin P.K., Schreiber S.L. and Crabtree G.R.** (1993) Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal

- transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin and cellular location. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4760-4769.
- Bram R.J. and Crabtree G.R.** (1994) Calcium signalling in T-cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* **371**, 355-358.
- Bucy R.P.** (1988) The effects of immunosuppressive pharmacological agents on the induction of cytotoxic and suppressor T lymphocytes *in vitro*. *Immunopharmacology* **15**, 65-71.
- Bunjes D., Hardt C., Röllinghoff M. and Wagner H.** (1981) Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2. *Eur. J. Immunol.* **11**, 657-661.
- Byrne J.A., Butler J.L. and Cooper M.D.** (1988) Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *J. Immunol.* **141**, 3249-3254.
- Cacalano N.A., Chen B.X., Cleveland W.L. and Erlanger B.F.** (1992) Evidence for a functional receptor for cyclosporin A on the surface of lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4353-4357.
- Calvo V., Crews C.M., Vik T.A. and Bierer B.E.** (1992) Interleukin 2 stimulation of p70 kinase activity is inhibited by the immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7571-7575.
- Cardenas M.E., Hemenway C., Muir R.S., Ye R., Fiorentino D. and Heitman J.** (1994) Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *EMBO J.* **13**, 5944-5957.
- Caroni P., Rothenfluh A., McGlynn E. and Schneider C.** (1991) S-cyclophilin. New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 10739-10742.
- Celis J.E., Dejgaard K., Madsen P., Leffers H., Gesser B., Honore B., Rasmussen H.H., Olsen E., Lauridsen J.B., Ratz G., Mouritzen S., Basse B., Hellerup M., Celis A., Puype M., van Damne J. and Vandekerckhove J.** (1991) The MRC-5 human embryonal lung fibroblast two-dimensional gel cellular protein database : quantitative identification of polypeptides whose relative abundance differs between quiescent, proliferating and SV40 transformed cells. *Electrophoresis* **11**, 1072-1113.
- Chambers C.A., Gallinger S., Anderson S.K., Giardina S., Ortaldo J.R., Hozumi N. and Roder J.** (1994) Expression of the NK-TR gene is required for NK-like activity in human T-cells. *J. Immunol.* **152**, 2669-2674.

- Chaudhary P.M., Mechetner E.B. and Roninson I.B.** (1992) Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* **80**, 2735-2739.
- Chung J., Kuo C.J., Crabtree G.R. and Blenis J.** (1992) Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kD S6 protein kinases. *Cell* **69**, 1227-1236.
- Cirillo R., Triggiana M., Siri L., Cicarelli A., Pettit G.R., Condorelli M. and Marone G.** (1990) Cyclosporin A rapidly inhibits mediator release from human basophils presumably by interacting with cyclophilin. *J. Immunol.* **144**, 3891-3897.
- Clipstone N.A. and Crabtree G.R.** (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695-697.
- Clipstone N.A., Fiorentino D.F. and Crabtree G.R.** (1994) Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes. *J. Biol. Chem.* **269**, 26431-26437.
- Colombani P., Robb A. and Hess A.** (1985) Cyclosporin A binding to calmodulin : A possible site of action on T lymphocytes. *Science* **228**, 337-339.
- Connern C.P. and Halestrap A.P.** (1992) Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl-*cis-trans*-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem. J.* **284**, 381-385.
- Connern C.P. and Halestrap A.P.** (1994) Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochem. J.* **302**, 321-324.
- Cullen B.R. and Heitman J.** (1994) Chaperoning a pathogen. *Nature* **372**, 319-320.
- Cyert M.S., Kunisawa R., Kaim D. and Thorner J.** (1991) Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7376-7380.
- Dallman M.J., Wood K.J. and Morris P.J.** (1987) Specific cytotoxic T cells are found in the non-rejected kidneys of blood-transfused rats. *J. Exp. Med.* **165**, 566-572.
- Davis T.R., Tabatabaī L., Bruns K. Hamilton R.T. and Nilsens-Hamilton M.** (1991) Basic fibroblast growth factor induces 3T3 fibroblasts to synthesize and secrete a cyclophilin-like protein and β_2 -microglobulin. *Biochim. Biophys. Acta* **1095**, 145-152.

- Demeule M., Giroux S., Murphy G.F. and Béliveau R.** (1994) Cyclosporin treatment alters protein phosphorylation in kidney membranes. *Biochem. Cell. Biol.* **72**, 143-151.
- Donnelly J.G. and Soldin S.J.** (1994) Partial characterization of a 52 kDa CsA/FK506/rapamycin binding protein. *Clin. Biochem.* **27**, 367-372.
- Dumont F.J., Staruch M.J., Koprak S.L., Siekerka J.J., Lin C.S., Harrison R., Sewell T., Kindt V.M., Beattie T.R., Wyvratt M. and Sigal N.H.** (1992) The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin. *J. Exp. Med.* **176**, 751-760.
- Dutz J.P., Fruman D.A., Burakoff S.J. and Bierer B.E.** (1993) A role for calcineurin in degranulation of murine cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **150**, 2591-2598.
- Elliott J.J. and Eisen M.N.** (1988) Allorecognition of purified major histocompatibility complex glycoproteins by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2728-2732.
- Emmel E.A., Verweij C.L., Durand D.B., Higgins K.M., Lacey E. and Crabtree G.R.** (1989) Cyclosporin-A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T-cell activation. *Science* **246**, 1617-1620.
- Erlanger B.F.** (1992) Do we know the site of action of cyclosporin? *Immunol. Today* **13**, 487-490.
- Etzkorn F.A., Chang Z., Stolz L.A. and Walsh C.T.** (1994) Cyclophilin residues that affect noncompetitive inhibition of the protein serine phosphatase activity of calcineurin by the cyclophilin-cyclosporin A complex. *Biochemistry* **33**, 2380-2388.
- Fejzo J., Etzkorn F.A., Clubb R.T., Shi Y., Walsh C.T. and Wagner G.** (1994) The mutant *Escherichia coli* F112W cyclophilin binds cyclosporin A in nearly identical conformation as human cyclophilin. *Biochemistry* **33**, 5711-5720.
- Ferrini V., Moretta A., Biassoni R., Nicolin A. and Moretta L.** (1986) Cyclosporin A inhibits IL-2 production by all human T-cell clones having this function, independent of the T4/T8 phenotype or the co-expression of cytolytic activity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **38**, 79-85.
- Fischer G., Bang H. and Mech C.** (1984) Detection of enzyme catalysis for *cis-trans* isomerization of peptide bonds using proline containing peptides as substrates. *Biomed. Biophys. Acta* **43**, 1101-1112.

- Fischer G. and Bang H.** (1985) The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* **828**, 39-42.
- Fischer G., Wittmann-Liebold B., Lang K., Kiefhaber T. and Schmid F.X.** (1989) Cyclophilin and peptidyl prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**, 476-478.
- Fischer G.** (1994) Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases and their effectors. *Angew. Chem.* **33**, 1415-1436.
- Flanagan W.M., Corthesy B., Bram R.J. and Crabtree G.R.** (1991) Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* **352**, 803-807.
- Fliri H., Bauman G., Enz A., Kullen J., Luyten M., Mikol M., Movva R., Quesniaux V., Schreier M., Walkinshaw M., Wenger R., Zenke G. and Zurini M.** (1993) Cyclosporins: structure activity relationships. *Annu. N.Y. Acad. Sci.* **696**, 47-53.
- Foxwell B.M.J., Frazer G., Winters M., Hiestand P.C., Wenger R. and Ryffel B.** (1988) Identification of cyclophilin as the erythrocyte cyclosporin-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* **938**, 447-455.
- Foxwell B.M.J., Hiestand P.C., Wenger R. and Ryffel B.** (1988) A comparison of cyclosporin binding by cyclophilin and calmodulin and the identification of a novel 45 Kd cyclosporin-binding phosphoprotein in Jurkat cells. *Transplantation* **46**, 35-40.
- Foxwell B.M.J., Wong W.C., Borel J.F. and Ryffel B.** (1989a) A comparison of cyclosporin binding by cyclophilin and calmodulin. *Transplant. Proc.* **21**, 873-875.
- Foxwell B.M.J., Mackie A., Ling V. and Ryffel B.** (1989b) Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporin binding protein. *Mol. Pharmacol.* **36**, 543-546.
- Foxwell B.M.J., Woerly G., Husi H., Mackie A., Quesniaux V.F.J., Hiestand P.C., Wenger R.M. and Ryffel B.** (1992) Identification of several cyclosporin binding proteins in lymphoid and non-lymphoid cells in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1138**, 115-121.
- Franco L., Jimenez A., Demolder J., Molemans F., Fiers W. and Contreras R.** (1991) The nucleotide sequence of a third cyclophilin-homologous gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 971-979.

- Franke E.K., Yuan H.E.H. and Luban J.** (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**, 359-362.
- Frantz B., Nordby E.C., Bren G., Steffan N., Paya C.V., Kincaid R.L., Tocci M.J., O'Keefe S.J. and O'Neill E.A.** (1994) Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I κ B/MAD3, an inhibitor of NF κ B. *EMBO J.* **13**, 861-870.
- Fraser J.D., Irving B.A., Crabtree G.R. and Weiss A.** (1991) Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the cell accessory molecule CD28. *Science* **251**, 313-316.
- Fraser J.D., Strauss D. and Weiss A.** (1993) Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunol. Today* **14**, 357-362.
- Freskgard P.O., Bergenhäm N., Jonsson B.H., Svensson M. and Carlsson U.** (1992) Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase. *Science* **258**, 467-468.
- Friedman J. and Weissman I.** (1991) Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell* **66**, 799-806.
- Friedman J., Trahey M. and Weissman I.** (1993) Cloning and characterization of cyclophilin C-associated protein: a candidate natural cellular ligand for cyclophilin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6815-6819.
- Frigerio G. and Pelham H.R.B.** (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* cyclophilin resident in the endoplasmic reticulum. *J. Mol. Biol.* **233**, 183-188.
- Fruman D.A., Klee C.B., Bierer B.E. and Burakoff S.J.** (1992a) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3686-3690.
- Fruman D.A., Mather P.E., Burakoff S.J. and Bierer B.E.** (1992b) Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2513-2517.
- Fruman D.A., Burakoff S.J. and Bierer B.E.** (1994) Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J.* **8**, 391-400.
- Galat A., Lane W.S., Standaert R.F. and Schreiber S.L.** (1992) A rapamycin-selective 25-kDa immunophilin. *Biochemistry* **31**, 2427-2434.
- Galat A.** (1993) Peptidylproline *cis-trans*-isomerases : immunophilins. *Eur. J. Biochem.* **216**, 689-707.
- Galat A. and Bouet F.** (1994) Cyclophilin B is an abundant protein whose conformation is similar to that of cyclophilin A. *FEBS Lett.* **347**, 31-36.

- Gasser C.S., Gunning D.A., Budelier K.A. and Brown S.M.** (1992) Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 9519-9523.
- Griffiths E.J. and Halestrap A.P.** (1991) Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase. *Biochem. J.* **274**, 611-614.
- Guerini A. and Klee C.B.** (1989) Cloning of human calcineurin A. Evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **56**, 9183-9187.
- Haddy A., Swanson S.K.H., Born T.L. and Rusnak F.** (1992) Inhibition of calcineurin by cyclosporin A-cyclophilin requires calcineurin B. *FEBS Lett.* **314**, 37-40.
- Haendler B., Hofer-Warbinek R. and Hofer E.** (1987) Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO J.* **6**, 947-950.
- Haendler B., Keller R., Hiestand P.C., Kocher H.P., Wegmann G. and Movva N.R.** (1989) Yeast cyclophilin: isolation and characterization of the protein, cDNA and gene. *Gene* **83**, 39-46.
- Haendler B. and Hofer E.** (1990) Characterization of the human cyclophilin gene and of related processed pseudogenes. *Eur. J. Biochem.* **190**, 477-482.
- Handschumacher R.E., Harding M.W., Rice J., Drugge R.J. and Speicher D.W.** (1984) Cyclophilin : A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**, 544-547.
- Harding M.W., Handschumacher R.E. and Speicher D.W.** (1986) Isolation and aminoacid sequence of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **261**, 8547-8555.
- Harding M.W., Galat A., Uchling D.E. and Schreiber S.L.** (1989) A receptor for the immunosuppressant FK-506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341**, 761-763.
- Harigai M., Hara M., Takahashi N., Kitami A., Hirose T., Suzuki K., Kawakami M., Hidaka T., Kawaguchi Y., Ishizuka T., Suzuki M., Kawagoe M. and Nakamura H.** (1992) Presence of autoantibodies to peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (cyclosporin A-binding protein) in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **63**, 58-65.

- Harrison R.K. and Stein R.L.** (1990) Substrate specificities of the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* **29**, 3813-3816.
- Hart D.N.J., Starling G.C., Calder V.L. and Fernando N.S.** (1993) B7/BB1 is a leukocyte differentiation antigen on human dendritic cells induced by activation. *Immunology*, **79**, 616-621.
- Hasel K.W., Glass J.R., Godbout M. and Sutcliffe J.G.** (1991) An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3483-3491.
- Hashimoto Y., Perrino B.A. and Soderling T.E.** (1986) Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *J. Biol. Chem.* **265**, 1924-1927.
- Hayano T., Takahashi N., Kato S., Maki N. and Suzuki M.** (1991) Two distinct forms of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells. *Biochemistry* **30**, 3041-3048.
- Higgins C.F.** (1993) The multidrug resistance P-glycoprotein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 684-687.
- Hsu V.L., Heald S.L., Harding M.W., Handschumacher R.E. and Armitage I.M.** (1990) Structural elements pertinent to the interaction of cyclosporin A with its specific receptor protein, cyclophilin. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 131-140.
- Hübner D., Drakenberg T., Forsen S. and Fisher G.** (1991) Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase activity as studied by dynamic proton NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* **284**, 79-81.
- Hultsch T., Alberts M.W., Schreiber S.L. and Hohman R.J.** (1991) Immunophilin ligands demonstrate common features of signal transduction leading to exocytosis or transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6229-6233.
- Husi H. and Zurini M.G.M.** (1994a) Comparative binding studies of cyclophilin to cyclosporine A by fluorescence measurements. *Analyt. Biochem.* **222**, 251-255.
- Husi H., Luyten M.A. and Zurini M.G.M.** (1994b) Mapping of the immunophilin-immunosuppressant site of interaction on calcineurin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14199-14204.
- Inoue T., Yoshida Y., Isaka Y. and Tagawa K.** (1993) Isolation of mitochondrial cyclophilin from bovine heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 857-863.
- Iwai N. and Inagami T.** (1990) Molecular cloning of a complementary DNA to rat cyclophilin-like protein mRNA. *Kidney Int.* **37**, 1460-1465.

- Jain J., McCaffrey P.G., Valge-Archer V.E. and Rao A.** (1992) Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* **356**, 801-804.
- Jain J., McCaffrey P.G., Miner Z., Kerppola T.K., Lambert J.N., Verdine G.L., Curran T. and Rao A.** (1993) The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* **365**, 352-355.
- Jayaraman T., Brillantes A.M., Timerman A.P., Fleischer S., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Marks A.R.** (1992) FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* **267**, 9474-9477.
- Jin Y.J., Albers M.W., Lane W.S., Biere B.E., Schreiber S.L. and Burakoff S.J.** (1991) Molecular cloning of a membrane-associated human FK506- and rapamycin-binding protein, FKBP-13. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6677-6681.
- Jin Y.J., Burakoff S.J. and Bierer B.E.** (1992) Molecular cloning of a 25-kDa high affinity rapamycin binding protein, FKPB25. *J. Biol. Chem.* **267**, 10942-10945.
- Jin Y.J. and Burakoff S.J.** (1993) The 25-kDa FK506-binding protein is localized in the nucleus and associates with casein kinase II and nucleolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 7769-7773.
- June C.H., Ledbetter J.A., Linsley P.S. and Thompson C.B.** (1990) Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today* **11**, 211-216.
- Kallen J., Spitzfaden C., Zurini M.G.M., Wider G., Widmer H., Wüthrich K. and Walkinshaw M.D.** (1991) Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nature* **353**, 276-279.
- Katagiri C., Kawamura T., Matsuzawa S., Mizuno Y., Matsumura S. and Kikuchi K.** (1993) Increases in protein phosphatase 2B activity in lymphoid tissues and T-lymphocytes of autoimmune MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J. Biochem.* **114**, 874-878.
- Ke H., Zydowsky L.D., Liu J. and Walsh C.T.** (1991) Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 9483-9487.
- Ke H., Zhao Y., Luo F., Weissman I. and Friedman J.** (1993a) Crystal structure of murine cyclophilin C complexed with immunosuppressive drug cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 11850-11854.
- Ke H., Mayrose D. and Cao W.** (1993b) Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of *cis-trans* isomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3324-3328.

- Kern D., Drakenberg T., Wikstrom M., Forsen S., Bang H. and Fischer G.** (1993) The *cis/trans* intraconversion of the calcium regulating hormone calcitonin is catalyzed by cyclophilin. *FEBS Lett.* **323**, 198-202.
- Kern G., Kern D., Schmid F.X. and Fischer G.** (1994) Reassessment of the putative chaperone function of prolyl *cis/trans*-isomerases. *FEBS Lett.* **348**, 145-148.
- Kieffer L.J., Thalhammer T. and Handschumacher R.E.** (1992) Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 5503-5507.
- Kieffer L.J., Seng T.W., Li W., Osterman D.G., Handschumacher R.E. and Bayney R.M.** (1993) Cyclophilin-40, a protein with homology to the p59 component of the steroid receptor complex. *J. Biol. Chem.* **268**, 12303-12310.
- Kim H.S., Raskova J., Degiannis D. and Raska J.R.** (1994) Effects of cyclosporine and rapamycin on immunoglobulin production by preactivated human B cells. *Clin. Exp. Immunol.* **96**, 508-512.
- Kincaid R.L., Takayama H., Billingsley M.L. and Sitkovsky M.V.** (1987) Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T lymphocytes and thymocytes. *Nature* **330**, 176-178.
- Koletsky A.J., Harding M.W. and Handschumacher R.E.** (1986) Cyclophilin : distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J. Immunol.* **137**, 1054-1059.
- Koser P.L., Bergsma D.J., Cafferkey R., Eng W.K., McLaughlin M.M., Ferrara A., Silverman C., Kasyan K., Bossard M.J., Johnson R.K., Porter T.G., Levy M.A. and Livi G.P.** (1991) The CYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase with an N-terminal sequence. *Gene* **108**, 73-80.
- Kratz A., Harding M.W., Craft J., Mackworth-Young C.G. and Handschumacher R.E.** (1992) Autoantibodies against cyclophilin in systemic lupus erythematosus and Lyme disease. *Clin. Exp. Immunol.* **90**, 422-427.
- Kronbach T., Fisher V. and Meyers A.** (1988) Cyclosporin metabolism in human liver : identification of a cytochrom P-450III gene family as the major cyclosporin-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporin with other drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* **43**, 630-635.
- Krönke M., Leonard W.J., Depper J.M., Arya S.K., Wong-Staal F., Gallo R.C., Waldman T.A. and Greene W.C.** (1984) Cyclosporin A inhibits T-cell growth

- factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, **81**, 5214-5218.
- Lad R.P., Smith M.A. and Hilt D.C.** (1992) Molecular cloning and regional distribution of rat brain cyclophilin. *Mol. Brain Res.* **9**, 239-244.
- Lang K., Schmid F.X. and Fischer G.** (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**, 268-270.
- Lang K. and Schmid F.X.** (1988) Protein-disulphide isomerase and prolyl isomerase act differently and independently as catalysts of protein folding. *Nature* **331**, 453-455.
- Larsen C.G., Anderson A.O., Appella E., Oppenheim J.J. and Matsushima K.** (1989) The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* **243**, 1464-1466.
- Larsen C.P., Morris P.J. and Austyn J.D.** (1990) Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. *J. Exp. Med.* **171**, 307-312.
- Legrue S.J., Friedman A.W. and Kahan B.D.** (1983) Lack of evidence for a cyclosporine receptor on human lymphocyte membranes. *Transplant. Proc.* **4**, 2259-2264.
- Legrue S.J., Turner R., Weisbrodt N. and Dedman J.R.** (1986) Does the binding of cyclosporin to calmodulin result in immunosuppression? *Science* **234**, 68-71.
- Li B., Sehajpal P.K., Subramaniam A., Joseph A., Stenzel K.H. and Suthanthiran M.** (1992) Inhibition of interleukin 2 receptor expression in normal human T cells by cyclosporine. *Transplantation* **53**, 146-151.
- Li W. and Handschumacher R.E.** (1993) Specific interaction of the cyclophilin-cyclosporin complex with the B subunit of calcineurin. *J. Biol. Chem.* **268**, 14040-14044.
- Lilie H., Lang K., Rudolph R. and Buchner J.** (1993) Prolyl isomerases catalyze antibody folding *in vitro*. *Prot. Science* **2**, 1490-1496.
- Lindholm A.** (1991) Therapeutic monitoring of cyclosporin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **41**, 273-281.
- Lindholm A.** (1991) Factors influencing the pharmacokinetics of cyclosporin in man. *Ther. Drug Monit.* **13**, 465-477.
- Linsley P.S., Brady W., Urnes M., Grosmaire L.S., Damle N.K. and Ledbetter J.A.** (1991) CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**, 561-569.

- Liu J., Albers M.W., Chen C.M., Schreiber S.L. and Walsh C.T.** (1990) Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic roles of cysteines by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2304-2308.
- Liu J., Farmer J.D.J., Lane W.S., Friedman J., Weissman I. and Schreiber S.L.** (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815.
- Liu J., Albers M.W., Wandless T.J., Luan S., Alberg D.G., Belshaw P.J. Cohen P., McKintosh C., Klee C.B. and Schreiber S.L.** (1992) Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* **31**, 3896-3901.
- Liu J.** (1993) FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol. Today* **14**, 290-295.
- Lodish H.F. and Kong N.** (1991) Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **266**, 14835-14838.
- Loosli H.R., Kessler H., Oschkinat H., Weber H.P., Pectcher T.J. and Widmer A.** (1985) The conformation of cyclosporin A in the crystal and in solution. *Helv. Chim. Acta* **68**, 682-704.
- Luan S., Li W., Rusnak F., Assmann S.M. and Schreiber S.L.** (1993) Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 2202-2206.
- Luan S., Albers M.W. and Schreiber S.L.** (1994) Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 984-988.
- Luban J., Bossolt K.L., Franke E.K., Kalpana G.V. and Goff S.P.** (1993) Human immunodeficiency virus type I gag protein binds to cyclophilin A and B. *Cell* **73**, 1067-1078.
- Marivet J., Frendo P. and Burkard G.** (1992) Effects of abiotic stresses on cyclophilin gene expression in maize and bean and sequence analysis of bean cyclophilin cDNA. *Plant Science* **84**, 171-178.
- Marks W.H., Harding M.W., Handschumacher R., Marks C. and Lorber M.I.** (1991) The immunochemical distribution of cyclophilin in normal mammalian tissues. *Transplantation* **52**, 340-345.

- Masy E., Labalette-Houache M. and Dessaint J.P.** (1994) Individual differences in the *in vitro* response to cyclosporin A (CsA) : possible heterogeneity in the involvement of the CD28-B7/BB1 pathway. *Therapie* 50, 271-277.
- Mattila P.S., Ullman K., Fiering S., Emmel E.A., McCutcheon M., Crabtree G.R. and Herzenberg L.A.** (1990) The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T-lymphocytes. *EMBO J.* 9, 4425-4433.
- McCaffrey P.G., Perrino B.A., Soderling T.R. and Rao A.** (1993a) NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J. Biol. Chem.* 268, 3747-3752.
- McCaffrey P.G., Luo C., Kerppola T.K., Jain J., Badalian T.M., Ho A.M., Burgeon E., Lane W.S., Lambert J.N., Curran T., Verdine G.L., Rao A. and Hogan P.G.** (1993b) Isolation of the cyclosporine-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science* 262, 750-754.
- McDonald M.L., Ardito T., Marks W.H., Kashgarian M. and Lorber M.I.** (1992) The effect of cyclosporin administration on the cellular distribution and content of cyclophilin. *Transplantation* 53, 460-466.
- McLaughlin M.M., Bossard M.J., Koser P.L., Cafferkey R., Morris R.A., Miles L.M., Strickler J., Bergsma D.J., Levy M.A. and Livi G.P.** (1992) The yeast cyclophilin multigene family: purification , cloning and characterization of a new isoform. *Gene* 111, 85-92
- Merker M.M. and Handschumacher R.E.** (1984) Uptake and nature of the intracellular binding of cyclosporin A in a murine thymoma cell line BW5147. *J. Immunol* 132., 3064-3070.
- Mikol V., Kallen J. and Walkinshaw M.D.** (1994) X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporin complex : comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5183-5186.
- Milan D., Griffith J., Su M., Price E.R. and McKeon F.** (1994) The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell* 79, 437-447.
- Montague J.W., Gaido M.L., Frye C. and Cidlowski J.A.** (1994) A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. *J. Biol. Chem.* 269, 18877-18880.
- Moss M.L., Palmer R.E., Kuzmic P., Dunlap B.E., Henzel W., Kofron J.L., Mellon W.S., Royer C.A. and Rich D.H.** (1992) Identification of actin and hsp70 as

- cyclosporin A binding proteins by photoaffinity labeling and fluorescence displacement assays. *J. Biol. Chem.* **267**, 22054-22059.
- Munro S. and Pelham H.R.B.** (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
- Nadeau K., Das A. and Walsh C.T.** (1993) Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* **268**, 1479-1487.
- Nelson P.A., Akselband Y., Kawamura A., Su M., Tung R.D., Rich D.H., Kishore V., Rosborough S.L., DeCenzo M.T., Livingston D.J. and Harding M.W.** (1993) Immunosuppressive activity of [MeBm₂t]¹-D-diaminobutyryl-8-, and D-aminopropyl-8-cyclosporin analogues correlates with inhibition of calcineurin phosphatase activity. *J. Immunol.* **150**, 2139-2147.
- O'Keefe S.J., Tamura J., Kincaid R.L. Tocci M.J. and O'Neill E.A.** (1992) FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* **357**, 692-694
- Otsuka M., Terada Y., Yang T.X., Nonoguchi H., Tomita K. and Marumo F.** (1994) Localization of cyclophilin A and cyclophilin C mRNA in murine kidney using RT-PCR. *Kidney Intern.* **45**, 1340-1345.
- Papageorgiou C., Borer X. and French R.R.** (1994) Calcineurin has a very tight-binding pocket for the side chain of residue 4 of cyclosporin. *Biorg. Medic. Chem. Lett.* **4**, 267-272.
- Peattie D.A., Harding M.W., Fleming M.A., DeCenzo M.T., Lippke J.A., Livingston D.J. and Benasutti M.** (1992) Expression and characterization of human FKPB52, an immunophilin that associates with the 90 kDa heat shock and is a component of steroid receptor complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 10974-10978.
- Peddada L.B., McPherson J.D., Law R., Wasmuth J.J., Youderian P. and Deans R.J.** (1992) Somatic cell mapping of the human cyclophilin B gene (PPIB) to chromosome 15. *Cytogenet. Cell. Genet.* **60**, 219-221.
- Pflügl G., Kallen J., Schirmer T., Jansonius J.N., Zurini M.G.M. and Walkinshaw M.D.** (1993) X-ray structure of a decameric cyclophilin-cyclosporin crystal complex. *Nature* **361**, 91-94.
- Povlsen J.V., Rasmussen A., Madsen M. and Lamm L.U.** (1990) Cyclosporin-induced immunosuppression *in vitro* : variation in sensitivity and binding capacity. *Scand. J. Immunol.* **32**, 45-51.

- Price E.R., Zydowsky L.D., Jin M., Baker C.H., McKeon F.D. and Walsh C.T. (1991)** Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1903-1907.
- Price D.J., Grove J.R., Calvo V., Avruch J. and Bierer B.E. (1992)** Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* **257**, 973-977.
- Price E.R., Jin M., Lim D., Pati S., Walsh C.T. and McKeon F.D. (1994)** Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3931-3935.
- Quesniaux V.F.J., Schreier M., Wenger R.M. and Van Regenmortel M. (1988)** Molecular characteristics of cyclophilin-cyclosporine interaction. *Transplantation* **46**, 23-27.
- Rahfeld J.U., Schierhorn A., Mann K. and Fischer G. (1994a)** A novel peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **343**, 65-69.
- Rahfeld J.U., Rücknagel K.P., Schelbert B., Ludwig B., Hacker J., Mann K. and Fischer G. (1994b)** Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett.* **352**, 180-184.
- Randak C., Brabletz T., Hergenröther M., Sobotta I. and Serfling E. (1991)** Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. *EMBO J.* **9**, 2529-2536.
- Ratajczak T., Carrello A., Mark P.J., Warner B.J., Simpson R.J., Moritz R.L. and House A.K. (1993)** The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J. Biol. Chem.* **268**, 13187-13192.
- Richards F.M., Milner J. and Metcalfe S. (1992)** Inhibition of the serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A in lymphocytes : effect on mRNA levels for interleukin-2, IL-2R α , krox-24, p53, hsc70 and cyclophilin. *Immunology* **76**, 642-647.
- Rinfret A. and Anderson S.K. (1993)** IL-2 regulates the expression of the NK-TR gene via an alternate RNA splicing mechanism. *Molec. Immunol.* **30**, 1307-1313.
- Rinfret A., Collins C., Ménard R. and Anderson S.K. (1994)** The N-terminal cyclophilin homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both

- peptidylprolyl *cis-trans* isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* **33**, 1668-1673.
- Rivière S., Ménez A. and Galat A. (1993) On the localization of FKBP25 in T-lymphocytes. *FEBS Lett.* **315**, 247-251.
- Rosen M.K. and Schreiber S.L. (1992) Natural products as probes of cellular function: studies of immunophilins. *Angewandte Chemie* **31**, 384-400.
- Rosenwirth B., Billich A., Datema R., Donatsch P., Hammerschmid F., Harrison R., Hiestand P., Jaksche H., Mayer P., Peichl P., Quesniaux V., Schatz F., Schuurman H.J., Traber R., Wenger R., Wolff B., Zenke G. and Zurini M. (1994) Inhibition of human immunodeficiency virus type I replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1763-1772.
- Rudd K.E., Sofia H.J., Koonin E.V., Plunkett G., Lazar S. and Rouviere P.E. (1995) A new family of peptidyl-prolyl isomerases. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 12-14.
- Ryffel B., Goetz U. and Heuberger B. (1982) Cyclosporin receptors on human lymphocytes. *J. Immunol.* **129**, 1978-1982.
- Ryffel B., Woerly G., Greiner B., Haendler B., Mihatsch M.J. and Foxwell B.M.J. (1991) Distribution of the cyclosporin binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* **72**, 399-404.
- Ryffel B., Woerly G., Quesniaux V.F.J., Husi H. and Foxwell B.M.J. (1992) Covalent binding of cyclosporine inhibits irreversibly T-lymphocyte activation. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 953-960.
- Ryffel B., Woerly G., Murray M., Eugster H.P. and Car B. (1993) Binding of active cyclosporins to cyclophilin A and B, complex formation with calcineurin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1074-1083.
- Saeki T., Ueda K., Tanigawara Y., Hori R. and Komano T. (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* **268**, 6077-6080.
- Sander B., Brigati C. and Möller E. (1986) Inhibition of *in vitro* alloreactivity by cyclosporin A : evidence for an interindividual variation in sensitivity. *Scand. J. Immunol.* **23**, 435-441.
- Sarris A.H., Harding M.W., Jiang T.R., Aftab D. and Handschumacher R.E. (1992) Immunofluorescent localization and immunochemical determination of cyclophilin-A with specific rabbit antisera. *Transplantation* **54**, 904-910.

- Schneider H., Charara N., Schmitz R., Wehrli S., Mikol V., Zurini M.G.M., Quesniaux V.F.J. and Movva N.R. (1994) Human cyclophilin C : primary structure, tissue distribution, and determination of binding specificity for cyclosporins. *Biochemistry* **33**, 8218-8224.
- Schneuwly S., Shortridge R.D., Larrivee D.C., Ono T., Ozaki M. and Pak W.L. (1989) *Drosophila ninaA* gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporin A binding protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5390-5394.
- Schönbrunner E.R., Mayer S., Tropshug M., Fischer G., Takahashi N. and Schmid F.X. (1991) Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.* **266**, 3630-3635.
- Schreiber S.L. (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* **251**, 283-287.
- Schreiber S.L. and Crabtree G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**, 136-142.
- Schuster D.L., Ehrlich G.K. and Murphy R.B. (1994) Purification and partial aminoacid sequence of a 28 kDa cyclophilin-like component of the rat liver sigma receptor. *Life Sciences* **55**, 151-156.
- Schwartz R.H. (1992) Costimulation of T-lymphocytes : the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**, 1065-1068.
- Sherry B., Yarlett N., Strupp A. and Cerami A. (1992) Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3511-3515.
- Shi Y., Sahai B.M. and Green D.R. (1989) Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* **339**, 625-626.
- Shieh B.H., Stamnes M.A., Seavello S., Harris G.L. and Zuker C.S. (1989) The *ninaA* gene required for visual transduction in *Drosophila* encodes a homologue of cyclosporin A-binding protein. *Nature* **338**, 67-70.
- Siekerka J.J., Staruch M.J., Hung S.H.Y. and Sigal N.H. (1989a) FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytoplasmic protein which is distinct from the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *J. Immunol.* **143**, 1580-1583
- Siekerka J.J., Hung S.H.Y., Poe M., Lin C.S. and Sigal N.H. (1989b) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* **341**, 755-757.

- Sigal N.H., Dumont F., Durette P., Siekerka J.J., Peterson L., Rich D.H., Dunlap B.E., Staruch M.J., Melino M.R., Koprak S.L. Williams D., Witzel B. and Pisano J.M.** (1991) Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A? *J. Exp. Med.* **172**, 619-628.
- Sigal N.H. and Dumont F.J.** (1992) Cyclosporin A, FK-506 and rapamycin: Pharmacological probes of lymphocyte signal transduction. *Ann. Rev. Immunol.* **10**, 519-560.
- Smith C.S., Ortega G., Parker L. and Shearer W.T.** (1994) Cyclosporin A blocks induction of tumor necrosis factor- α in human B lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 383-390.
- Smith D.F., Baggenstross B.A., Marion T.N. and Rimerman R.A.** (1993) Two FKBP-related proteins are associated with progesterone receptor complexes. *J. Biol. Chem.* **268**, 18365-18371.
- Soldin S.J.** (1992) Drug receptor assays : quo vadis? *Ann. Clin. Biochem.* **29**, 132-136.
- Spik G., Haendler B., Delmas O., Mariller C., Chamoux M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Stedman K., Kocher H.P., Keller R., Hiestand P.C. and Movva N.R.** (1991) A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J. Biol. Chem.* **266**, 10735-10738.
- Spitzfaden C., Weber H.P., Braun W., Kallen J., Wider G., Widmer H., Walkinshaw M.D. and Wüthrich K.** (1992) Cyclosporin A-cyclophilin complex formation. A model based on X-ray and NMR data. *FEBS Lett.* **300**, 291-300.
- Stamnes M.A., Shieh B.H., Chuman L., Harris G.L. and Zuker C.S.** (1991) The cyclophilin homolog *ninaA* is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of *Drosophila* rhodopsins. *Cell* **65**, 219-227.
- Steinmann B., Bruckner P. and Superti-Furga A.** (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation *in vivo* : indirect evidence for a physiologic role of peptidyl prolyl cis-trans isomerase. *J. Biol. Chem.* **266**, 1299-1303.
- Swanson S.K.H., Born T., Zydowsky L.D., Cho H., Chang H.Y., Walsh C.T. and Rusnak F.** (1992) Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3741-3745.
- Sykes K., Gething M.J. and Sambrook J.** (1993) Proline isomerases function during heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5853-5857.
- Szabo I. and Zoratti M.** (1991) The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **266**, 3376-3379.

- Szamel M., Bartels F. and Resch K.** (1993) Cyclosporin A inhibits T cell receptor-induced interleukin-2 synthesis of human T lymphocytes by selectively preventing a transmembrane signal transduction pathway leading to sustained activation of a protein kinase C isoenzyme, protein kinase C- β . *Eur. J. Immunol.* **23**, 3072-3081.
- Takahashi N., Hayano T. and Suzuki M.** (1989) Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**, 473-475.
- Takeshita T., Asao H., Ohtani K. and Ishii N.** (1992) Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science* **257**, 379-382.
- Tamai I. and Safa A.R.** (1991) Azidopine noncompetitively interacts with vinblastine and cyclosporin A binding to P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 16796-16800.
- Thalhammer T., Kieffer L.J., Jiang T.R. and Handschumacher R.E.** (1992) Isolation and partial characterization of membrane-associated cyclophilin and related 22-kDa glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* **206**, 31-37.
- Thall M., Bukovsky A., Kondo E., Rosenwirth B., Walsh C.T., Sodroski J. and Göttinger H.G.** (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**, 363-365.
- Thériault Y., Logan T.M., Meadows R., Yu L., Olejniczak E.T., Holzman T.F., Simmer R.L. and Fesik S.W.** (1993) Solution structure of the cyclosporin A/cyclophilin complex by NMR. *Nature* **361**, 88-91.
- Trandinh C.C., Pao G.M. and Saier M.H.** (1992) Structural and evolutionary relationships among the immunophilins: two ubiquitous families of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases. *FASEB J.* **6**, 3410-3420.
- Trenn G., Taffs R., Hohman R., Kincaid R., Shevach E.M. and Sitkovsky M.** (1989) Biochemical characterization of the inhibitory effect of CsA on cytolytic lymphocyte effector functions. *J. Immunol.* **142**, 3796-3804.
- Tropschug M., Nicholson D.W., Hartl F.U., Köhler H., Pfanner N., Wachter E. and Neupert W.** (1988) Cyclosporin A-binding protein (cyclophilin) of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **28**, 14433-14440.
- Tropschug M., Barthelmess L.B. and Neupert W.** (1989) Sensitivity to cyclosporin A is mediated by cyclophilin in *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **342**, 953-955.

- Tyler J.D., Galli S.J., Snider M.E., Dvorak A.M. and Steinmuller R.** (1984) Cloned Lyt2⁺ cytolytic T lymphocytes destroy allogenic tissue *in vivo*. *J. Exp. Med.* **159**, 234-239.
- Uhing M.R., Goldman A.S. and Goto M.P.** (1993) Cyclosporin A-induced embryopathy in embryo culture is mediated through inhibition of the arachidonic acid pathway. *P.S.E.B.M.* **202**, 307-314.
- Ullman K.S., Northrop J.P., Verweij C.L. and Crabtree G.R.** (1990) Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune functions : the missing link. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 421-445.
- Van Gool S.W., Ceuppens J.L., Walter H. and de Boer M.**(1994) Synergy between cyclosporin A and a monoclonal antibody to B7 in blocking alloantigen-induced T-cell activation. *Blood* **83**, 176-183.
- Von Wartburg A. and Traber R.** (1986) Chemistry of the natural cyclosporin metabolites. *Prog. Allergy* **38**, 28-45.
- Walkinshaw M.D., Kallen J., Weber H. P., Widmer A., Widmer H. and Zurini M.** (1992) Immunophilin structure: a template for immunosuppressive drug design. *Transplant. Proc.* **24**, 8-13.
- Walsh C.T., Zydowsky L.D. and McKeon F.D.** (1992) Cyclosporin A, the cyclophilin class of peptidyl prolyl isomerases, and blockade of T cell signal transduction. *J. Biol. Chem.* **267**, 12115-12118.
- Wang T., Donahoe P.K. and Zervos A.S.** (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF- β family with the immunophilin FKBP12. *Science* **265**, 674-676.
- Weber C., Wider G., von Freyberg B., Traber R., Braun W., Widmer H. and Wüthrich K.** (1991) The NMR structure of cyclosporin A bound to cyclophilin in aqueous solution. *Biochemistry* **30**, 6563-6574.
- Weiss A.** (1993) T cell antigen receptor signal transduction : a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* **73**, 209-212.
- Wenger R.M., France J., Bovermann G., Walliser L., Widmer A. and Widmer H.** (1994) The 3D structure of a cyclosporin analogue in water is nearly identical to the cyclophilin-bound cyclosporin conformation. *FEBS Lett.* **340**, 255-259.
- Willershausen-Zönnchen B., Lemmen C. and Schumacher U.** (1992) Influence of cyclosporine A on growth and extracellular matrix synthesis of human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **152**, 397-402.

- Wüthrich K., von Freyberg B., Weber C., Wider G., Traber R., Widmer H. and Braun W. (1991)** Receptor-induced confirmation change of the immunosuppressant cyclosporin A. *Science* **254**, 953-955.
- Xu Q., Leiva M.C., Fischkoff S.A., Handschumacher R.E. and Lyttle C.R. (1992)** Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **267**, 11968-11971.
- Zeder-Lutz G., Wenger R., Van Regenmortel M.H.V. and Altschuh D. (1993)** Interaction of cyclosporin A with a Fab fragment or cyclophilin. *FEBS Lett.* **326**, 153-157.

Appendice technique

L'ensemble des matériels et méthodes a déjà été décrit dans les trois articles présentés. Nos premières expériences ont été réalisées à partir d'un lot de CyPB généreusement fourni par les Laboratoires Sandoz (Bâle). Cependant, nos besoins étant de plus en plus importants, il nous a fallu préparer nous-mêmes la protéine recombinante en plus grandes quantités. Nous allons donc présenter ci-dessous la stratégie utilisée pour la production de la CyPB recombinante, ainsi que les techniques d'analyse des protéines, appliquées au suivi de la purification de la CyPB, et à l'étude de la spécificité de reconnaissance des anticorps anti-cyclophiline.

I. Production de la CyPB recombinante

A. Préparation du plasmide codant pour la CyPB recombinante

La CyPB est présente dans le réticulum endoplasmique, et retrouvée sécrétée dans les liquides biologiques. Une telle localisation implique que son ARNm code pour un peptide signal, séquence qui n'est pas retrouvée dans la protéine mature. Etant donné le risque que la bactérie ne reconnaisse pas ou peu ce peptide signal, et de ce fait, synthétise une protéine non conforme au produit attendu, l'insert introduit dans le vecteur d'expression de la CyPB recombinante correspond à une forme tronquée de l'ADNc de la protéine. La stratégie utilisée a été décrite par Spik *et al.* (1991), et les principales étapes peuvent être récapitulées de la façon suivante :

- purification de la CyPB du lait de Femme.
- hydrolyse ménagée de la protéine et séquençage des peptides obtenus.
- synthèse de sondes oligonucléotidiques à partir de ces peptides.
- recherche de la séquence nucléotidique de la cyclophiline B par criblage d'une banque d'ADNc humains.
- synthèse de l'insert, sans la séquence du peptide signal et en phase de lecture, par "Polymerase Chain Reaction".

Le vecteur d'expression choisi pour l'expression de la protéine est le plasmide pKK233-2 (Pharmacia), qui contient :

- une séquence promoteur lacZ, permettant une induction de l'expression de l'insert par l'IPTG (isopropyl thio-galactoside).

- une séquence d'insertion, site "polylinker", pouvant être coupée par différentes enzymes de restriction.

- une séquence de résistance à l'ampicilline, permettant de faire une sélection directe des bactéries ayant reçu le plasmide vis à vis de cet antibiotique.

La séquence clonée de la CyPB mature a été incorporée dans le plasmide au niveau des sites de restriction NcoI et HindIII, avec conservation de la phase de lecture. Le plasmide recombinant a été nommé pCGF-72.

La bactérie compétente EC682 a été sélectionnée par les Laboratoires Sandoz pour ses propriétés remarquables de croissance et d'expression élevée de protéine recombinante. Il s'agit d'une souche d'E.coli sensible à l'ampicilline et déficiente au niveau de son opéron lactose. Le vecteur pCGF-72 a été introduit dans la bactérie par électroporation, et la souche transformée a été sélectionnée par sa résistance à l'ampicilline conférée par le plasmide.

B. Culture de la bactérie transformée

La fermentation a été réalisée en collaboration avec le Lycée Technique Valentine Labbé de Lille, qui a mis à notre disposition un fermenteur d'une capacité de 2 litres, de marque Biolafitte. Ce type de fermenteur a été préféré car de nombreux paramètres peuvent être mesurés et réglés au cours de la fermentation, assurant ainsi la croissance optimale du micro-organisme et un rendement élevé de production de la protéine recombinante.

Les bactéries transformées sont cultivées dans un milieu LB (Tryptone : 10 g/l ; Extrait de levure ; 5 g/l ; NaCl : 5 g/l ; MgSO₄ : 2,46 g/l), en présence d'ampicilline à 10 mg/l. La culture est alimentée en continu par une solution de glucose stérile, et maintenue à une température de 37°C et à un pH optimum de 7,2. La croissance des bactéries est ainsi suivie jusqu'à une absorbance de 3 à 600 nm. A ce moment, l'induction du plasmide est provoquée par addition d'une solution d'IPTG à la concentration finale de 10⁻³ M, et la fermentation est poursuivie pendant 3 heures dans les mêmes conditions.

C. Extraction et purification de la CyPB recombinante

Le moût de fermentation (2 l) est récupéré et centrifugé pendant 30 min à 3000 g. Le culot bactérien est resuspendu dans un tampon PBS/EDTA 1 mM, pH 7,2, et lavé trois fois dans le même tampon par centrifugation à 3000 g pendant 30 min. Le culot est ensuite

récupéré dans 40 ml de PBS/EDTA 10 mM, pH 7,4. L'extraction des protéines bactériennes est réalisée sur glace par 4 cycles de sonication de 3 min. Le lysat est ensuite centrifugé à 10000 g pendant 60 min, et le surnageant est dialysé pendant 48 h à 4°C, contre un tampon phosphate 20 mM, pH 6,5. La solution est à nouveau centrifugée à 10000 g pendant 60 min, afin d'éliminer les précipités formés, puis clarifiée sur filtre Millipore 0,22 µm.

La purification est réalisée par chromatographie d'échange de cations sur une colonne Mono-S 10x15 en mode FPLC (Pharmacia).

La solution dialysée et filtrée est déposée en continu sur la colonne de FPLC. Après rinçage du gel et élution des protéines non fixées (tampon phosphate 20 mM, pH 6,5), les protéines retenues sont éluées par un gradient discontinu en NaCl. Les fractions obtenues sont ensuite analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), et la présence de CyPB est confirmée par immunorévélation après électrotransfert sur nitrocellulose.

Cette méthode de purification permet de récupérer la majorité de la CyPB dans la fraction 0,22 M en NaCl, avec un rendement de production d'environ 20 mg /l de culture et un taux de pureté supérieur à 95 %.

II. Méthodes d'analyse des protéines

A. Préparation des échantillons

Des aliquotes des fractions obtenues en FPLC sont préalablement concentrés par précipitation à l'ATCA 10%. Les protéines précipitées sont centrifugées à 10 000 g pendant 15 min puis lavées deux fois par de l'éthanol absolu afin d'éliminer les traces d'ATCA. Le culot est ensuite séché par évaporation.

Des homogénats de protéines cellulaires sont préparés pour l'étude de la spécificité de reconnaissance des différents anticorps anti-cyclophiline. La lyse des cellules est réalisée dans un volume minimum de PBS, Triton X-100 1%. Un inhibiteur de protéase, le diisopropyl-fluorophosphate (Sigma), est ajouté afin de prévenir toute dégradation des protéines libérées. La solution est incubée toute la nuit à 4°C sous agitation rotative et le matériel cellulaire non soluble est éliminé par centrifugation à 10 000 g pendant 30 min.

Les échantillons sont repris dans un tampon échantillon d'électrophorèse Tris-HCl 10 mM pH 8,8, SDS 10%, glycérol 10%, Bleu de Bromophénol, centrifugés pendant 5 min à 10 000 g puis chauffés à 100°C pendant 5 min avant d'être analysés en SDS-PAGE.

B. Electrophorèse et électrotransfert des protéines

Les électrophorèses en SDS-PAGE sont réalisées dans un appareil vertical en plaques (1,5 X 140 X 160) de marque Hoeffer Scientific Instruments. Les indices de réticulation sont de 15 % pour les gels de séparation (Tris-HCl, pH 8,8) et de 5 % pour le gel de concentration (Tris-HCl, pH 6, 8). Le tampon de migration est une solution Tris / glycolle / SDS (25 mM / 200 mM / 0,1 %), pH 8,6. L'électrophorèse est réalisée à 150 V sous réfrigération. Après migration, les protéines sont soit directement révélées par coloration au bleu de Coomassie, soit transférées sur membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Schleicher & Schull).

L'électrotransfert est réalisé dans une cuve Biorad pendant une nuit à 4°C, dans un tampon Tris / glycolle / méthanol (25 mM / 200 mM / 20 %), pH 8,4.

C. Immunorévélation des protéines

Après transfert des protéines, la membrane de nitrocellulose est saturée par une solution de PBS / gélatine 2 %, pH 7,4, pendant 1 h à 20°C, de façon à bloquer tous les sites restés libres. La membrane est ensuite lavée par une solution de PBS / Tween-20 0,05%, puis incubée pendant 2 h dans une solution PBS / BSA 1 %, pH 7,4, en présence du premier anticorps. Le repérage et l'identification de la CyPB après fractionnement sont réalisés à l'aide d'un anticorps anti-CyPB (10 µg/ml). Quant à l'étude de la spécificité de reconnaissance des anticorps anti-cyclophiline et anti-peptide, elle est réalisée en incubant différentes dilutions des immunosérums à analyser en présence des lysats cellulaires. Après un nouveau lavage, la membrane est incubée pour 2 h en présence du second anticorps anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase (1/2000). Finalement, les protéines sont révélées en présence de DAB, 0,04 %, H₂O₂, 1 %, dans un tampon PBS, pH 7,4.

