

N° d'ordre : 2157

**THESE**

**présentée à**

**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

**pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

**Option : Sciences de la Vie et de la Santé**

**par**

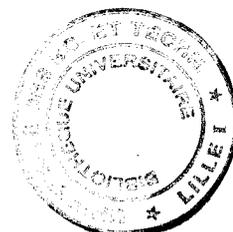
**Agnès DENYS**

**LES RECEPTEURS LYMPHOCYTAIRES DE LA  
CYCLOPHILINE B**

**MISE EN EVIDENCE DE DEUX SITES DE FIXATION MEMBRANAIRES  
ROLE DE LA CYPB DANS L'IMMUNOSUPPRESSION**

Soutenue le 12 décembre 1997 devant la commission d'examen :

**Président** : Professeur André VERBERT  
**Rapporteurs** : Professeur Jean-Paul DESSAINT  
Docteur Jack-Michel RENOIR  
**Examineurs** : Docteur Brian FOXWELL  
Docteur Bernard HAENDLER  
Professeur Geneviève SPIK



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 mes parents,*  
*A mes soeurs,*  
*A mes grands-parents,*

avec toute mon affection.

*A Monsieur le Professeur André VERBERT,*

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

*A Madame le Professeur Geneviève SPIK,*

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de la confiance que vous m'avez témoignée au cours de ces années de travail en commun. J'ai toujours trouvé auprès de vous beaucoup de gentillesse, de disponibilité ainsi que de précieux conseils. Trouvez dans ce travail l'expression de toute ma reconnaissance.

*A Monsieur le Professeur Jean-Paul DESSAINT,*

Vous avez suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance, en nous prodiguant toujours de précieux conseils. Votre venue en tant que Rapporteur de cette thèse m'a fait extrêmement plaisir. Veuillez croire en l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma profonde gratitude.

*A Monsieur le Docteur Jack-Michel RENOIR,*

Vous m'avez fait l'honneur d'être Rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

*A Monsieur le Docteur Bernard HAENDLER,*

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ces travaux que vous avez toujours suivi avec beaucoup d'intérêt. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

*A Monsieur le Docteur Brian FOXWELL,*

Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements d'avoir accepté de juger ce travail malgré la barrière de la langue ; c'est pour moi un honneur. Je vous remercie également de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, dans le cadre du contrat BIOMED.

*Je tiens également à remercier tout particulièrement,*

*Monsieur le Professeur Emérite Jean MONTREUIL*, votre dynamisme et votre passion pour la Recherche ont toujours été pour moi un exemple, et je tiens à vous exprimer ma plus vive reconnaissance et mon profond respect.

*Fabrice*, pour tes conseils mais également pour ta disponibilité, ta patience, ton amitié et ton appui dans les moments difficiles. J'ai trouvé beaucoup de plaisir à travailler à tes côtés et à participer à la petite histoire de la "Cyclo". Je t'en remercie sincèrement.

*Christophe, Mathieu et Sandrine*, membres de l'équipe "Cyclo", pour votre aide et votre amitié, mais également pour les bons moments passés ensemble, je tiens à vous témoigner toute mon amitié.

*Eric*, pour tes précieuses connaissances et ton étroite collaboration dans le domaine des transplantations d'organes.

*Tous les membres du contrat européen BIOMED*, pour leur collaboration et leurs précieux conseils.

*Tous les membres de l'équipe "Lacto"*, pour votre amitié et la bonne ambiance qui ont accompagné ce travail.

*Daniel*, pour ton aide précieuse lors de la réalisation de mes diapositives.

*Catherine et Anne-Marie*, pour votre amitié et votre soutien moral.

Et tous ceux qui, par leur sympathie et leurs encouragements m'ont soutenue tout au long de ces années.

# *Sommaire*

---

# SOMMAIRE

<i>Résumé</i>	10
<i>Abréviations</i>	11
<i>Introduction</i>	13
<i>Généralités</i>	18
<b><u>LES IMMUNOPHILINES</u></b>	
<b>I- LES DIFFERENTES FAMILLES DES IMMUNOPHILINES</b>	19
<b>A- Les Cyclophilines</b>	19
<u>1- Les formes majeures</u>	19
<i>a. La Cyclophiline A</i>	19
<i>b. La Cyclophiline B</i>	21
<i>c. La Cyclophiline C</i>	23
<i>d. La Cyclophiline D</i>	24
<i>e. La Cyclophiline 40</i>	24
<u>2- Les formes mineures</u>	25
<i>a. La Cyclophiline 33</i>	25
<i>b. Les autres Cyclophilines sécrétées</i>	25
<i>c. Les Cyclophilines membranaires</i>	26
$\alpha$ - Le récepteur NK-TR des cellules NK	26
$\beta$ - La RS-cyclophiline	28
$\gamma$ - Le produit du gène Nina A	28
<b>B- Les FKBP</b>	29
<u>1- Les formes majeures</u>	29
<i>a. La FKBP12</i>	29
<i>b. La FKBP13</i>	31
<i>c. La FKBP25</i>	32
<i>d. La FKBP52</i>	33
<u>2- Les formes mineures</u>	34
<i>a. La FKBP12A</i>	34
<i>b. La FKBP12,6</i>	34
<i>c. Les FKBP 51 et 54</i>	34
<i>d. La FKBP65</i>	35

<b>II- LES PROPRIETES COMMUNES DES IMMUNOPHILINES .....</b>	<b>35</b>
A- Activité Peptidyl Prolyl <i>Cis-Trans</i> Isomerase .....	35
B- Récepteurs des immunosuppresseurs .....	39
1- La CsA .....	39
2- Le FK506 .....	40
3- La rapamycine .....	40
C- Interaction immunosuppresseur/immunophiline .....	40
1- Les complexes CsA/CyP .....	42
2- Les complexes FK506/FKBP ou rapamycine/FKBP .....	44
3- Les autres PPIases .....	44
a. La parvuline .....	44
b. Le Trigger factor .....	44

## **IMMUNOSUPPRESSION**

<b>I- L'IMMUNITE DE GREFFE .....</b>	<b>47</b>
A- Les antigènes reconnus sur la greffe et les cellules sensibilisantes .....	47
B- Mécanismes de rejet de greffe .....	48
1- <u>La phase de sensibilisation</u> .....	48
a. <i>Activation des lymphocytes T</i> .....	48
$\alpha$ - Les différentes étapes d'activation .....	48
$\beta$ - La transmission des signaux d'activation par le TCR ..	49
$\gamma$ - Prolifération des lymphocytes T .....	52
b. <i>Activation des cellules endothéliales</i> .....	53
2- <u>Migration et infiltration des lymphocytes</u> .....	53
a. <i>Les sélectines</i> .....	55
b. <i>Les chimiokines</i> .....	56
c. <i>Les GAG des cellules endothéliales et des lymphocytes</i> .....	57
$\alpha$ - A la surface des cellules endothéliales .....	57
$\beta$ - A la surface des lymphocytes T .....	59
3- <u>La phase effectrice</u> .....	59
<b>II- PREVENTION DU REJET DE GREFFE .....</b>	<b>60</b>
A- Le traitement immunosuppresseur .....	60
B- Activités des immunosuppresseurs .....	60
1- <u>Immunosuppression par la CsA et le FK506</u> .....	60
2- <u>Immunosuppression par la rapamycine</u> .....	62
C- Mécanisme moléculaire des immunosuppresseurs .....	63
1- <u>Les complexes immunophiline/immunosuppresseur</u> .....	63

a. <i>L'activité immunosuppressive est indépendante de l'activité PPIase</i> .....	63
b. <i>L'activité immunosuppressive est dépendante de la formation des complexes immunosuppresseur/immunophiline</i> .....	64
c. <i>Les immunophilines impliquées dans l'immunosuppression</i> .....	65
2- <u>Cibles des complexes immunophiline/ immunosuppresseur</u> .....	66
a. <i>La calcineurine, cible des complexes CsA/CyPA et FK506/FKBP12</i> .....	66
α - Mise en évidence .....	66
β - Mode d'action moléculaire de la CsA et du FK506 .....	68
b. <i>La cible du complexe FKBP12/rapamycine</i> .....	68
α - Les activités kinases inhibées par la rapamycine .....	68
β - Cible potentielle de la rapamycine .....	69
<b>III- HETEROGENEITE DE LA REPONSE A LA CSA</b> .....	70
A- Pharmacocinétique et métabolisme .....	72
1- <u>Absorption</u> .....	72
2- <u>Distribution</u> .....	72
a. <i>Distribution dans les tissus</i> .....	72
b. <i>Distribution dans le sang et le plasma</i> .....	72
α - Liaison érythrocytaire .....	72
β - Liaison aux protéines plasmatiques .....	73
γ - Liaison aux autres cellules du sang .....	73
δ - Forme libre .....	74
3- <u>Métabolisme</u> .....	74
B- Marge thérapeutique .....	75
C- Variations de sensibilité à la CsA .....	76
1- <u>Sensibilité inter-individuelle à la CsA</u> .....	76
2- <u>Sensibilité intra-individuelle à la CsA</u> .....	77
a. <i>Phénotype lymphocytaire de la réponse</i> .....	77
b. <i>Voies de transduction impliquées dans l'activation des lymphocytes</i> .....	78
α - Voies sensibles à la CsA .....	78
β - Voies résistantes à la CsA .....	78
c. <i>Les facteurs intracellulaires influençant la réponse</i> .....	79
d. <i>Les facteurs extracellulaires influençant la réponse</i> .....	79

## ACTIVITES BIOLOGIQUES DES IMMUNOPHILINES

<b>I- ACTIVITE CHAPERONE, MISE EN CONFORMATION DE PROTEINES</b> .....	81
A- Repliement de protéines <i>in vitro</i> .....	81

B- Mise en conformation des protéines <i>in vivo</i> .....	82
1- <u>Des preuves indirectes</u> .....	82
2- <u>Rôle de Nina A dans la mise en conformation des rhodopsines</u> .....	83
<b>II- INTERACTION DES IMMUNOPHILINES AVEC DES PROTEINES CIBLES</b> .....	84
A- Protéines associées au Ca <sup>2+</sup> .....	84
1- <u>Interactions de la FKBP12 avec les canaux calciques intracellulaires</u> ..	84
2- <u>Interaction de la CyPD avec le canal ADP/Ca<sup>2+</sup> mitochondrial</u> .....	85
B- Protéines impliquées dans l'activation des lymphocytes .....	87
1- <u>Interaction avec la calcineurine</u> .....	87
2- <u>Interaction avec la CAML</u> .....	88
C- Interaction de la CyPC avec la CyCAP .....	89
D- Interaction de la FKBP12 avec le récepteur du TGFβ .....	90
E- Interaction avec le récepteur des hormones stéroïdes .....	90
<b>III- PROPRIETES PARTICULIERES</b> .....	92
A- Activité chimiotactile .....	92
B- Activité mitogène .....	93
C- Activité nucléaire .....	93
D- Interaction de la CyPA et de la CyPB avec la Protéine Gag de HIV-1 .....	94
<b><u>CONCLUSION</u></b> .....	96
 <i>Travaux personnels</i> .....	98
<b>INTRODUCTION</b> .....	98
<b>I- FIXATION DE LA CYPB A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES.</b>	100
A- Fixation de la CyPB à la surface des cellules de lignées lymphoblastiques .....	100
B- Fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T circulants .....	103
1- <u>Fixation de la CyPB marquée à la fluorescéine</u> .....	103
a. <i>Préparation de la CyPB fluorescente</i> .....	103

<i>b. Fixation de la CyPB-S-fluorescéine à la surface des PBL</i> .....	105
<u>2- Fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB</u> .....	105
<u>3- Comparaison de la fixation de la CyPB entre les lymphocytes quiescents et activés</u> .....	106
<i>a. Fixation de la CyPB fluorescente</i> .....	106
<i>b. Fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB</i> .....	107
<u>4- Phénotype des cellules fixant la CyPB</u> .....	110
C- Discussion .....	111
<b>II- IDENTIFICATION DES SITES DE FIXATION DE LA CYPB EXPRIMES A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES T</b> .....	116
A- Etude des interactions entre la CyPB et l'héparine .....	116
<u>1- Sensibilité à la force ionique</u> .....	116
<u>2- Inhibition de fixation de la CyPB par les GAG</u> .....	117
<u>3- Compétition de fixation par les ligands de l'héparine</u> .....	119
<u>4- Influence de la CsA sur la fixation de la CyPB à l'héparine</u> .....	119
<i>a. Inhibition de fixation par la CsA</i> .....	119
<i>b. Fixation du complexe [<sup>14</sup>C]-CsA/CyPB sur héparine-Sépharose</i> .....	121
<i>c. Fixation du complexe [<sup>14</sup>C]-CsA/CyPB sur colonne LH-20 en présence ou en absence d'héparine</i> .....	121
<u>5- Conclusion</u> .....	123
B- Etudes des différents sites d'interaction de la CyPB à la surface des lymphocytes circulants .....	123
<u>1- Effets de la force ionique et du pH</u> .....	123
<u>2- Recherche des sites de type GAG sulfatés</u> .....	124
<i>a. Inhibition de fixation par les GAGs</i> .....	124
<i>b. Traitement enzymatique des membranes</i> .....	127
<i>c. Compétition de fixation par des HBP</i> .....	129
<i>d. Conclusion</i> .....	132
<u>3- Recherche des sites non glycaniques</u> .....	132
<i>a. Compétition de fixation de la CyPB</i> .....	132
<i>b. Importance du domaine catalytique dans la fixation de la CyPB</i> .....	133
α - Inhibition de la fixation par des analogues de cyclosporine .....	133
β - Effet de l'association CsA et protamine .....	136
<i>c. Conclusion</i> .....	136
<u>4- Caractéristiques des sites de fixation de la CyPB sur les lymphocytes T</u> .....	136
C- Discussion .....	139

<b>III- DEVENIR DE LA CYPB APRES FIXATION SUR LES LYMPHOCYTES TOTAUX</b> .....	144
A- Signaux intracellulaires induits par la fixation de la CyPB ....	144
B- Endocytose de la CyPB .....	146
<u>1- Internalisation de la CyPB dans les cellules Jurkat</u> .....	146
<u>2- Internalisation de la CyPB dans les lymphocytes circulants</u> .....	148
C- Fixation et endocytose du complexe CyPB/[ <sup>3</sup> H]-CsA .....	153
1- Fixation du complexe tritié .....	153
<u>2- Endocytose du complexe tritié</u> .....	156
D- Discussion .....	158
<b>IV- ROLE DE LA CYPB DANS L'IMMUNOSUPPRESSION</b> .....	161
A- Mesure du taux de CyPB plasmatique chez les patients traités à la CsA .....	161
B- Distribution de la CyPB entre les différents compartiments du sang .....	167
1- <u>Distribution de la CsA libre et complexée entre les compartiments du sang</u> .....	167
2- <u>Incorporation de la CsA seule ou complexée dans les PBMC</u> .....	169
C- Rôle de la CyPB dans l'activité immunosuppressive de la CsA .....	171
1- <u>Activité immunosuppressive du complexe CyPB/CsA</u> .....	171
2- <u>DI<sub>50</sub> du complexe CyPB/CsA et de la CsA seule dans le sang total et les PBMC isolés</u> .....	171
3- <u>Rôle du récepteur de la CyPB dans la sensibilité au complexe CyPB/CsA</u> .....	174
4- <u>Homogénéité de la réponse à la CsA en présence de CyPB</u> .....	175
D- Discussion .....	178
 <i>Conclusion générale</i> .....	 181
 <i>Bibliographie</i> .....	 190

<i>Appendice technique</i>	214
<b>I- Matériels</b>	214
A- La CyPB recombinante	214
B- Les dérivés de cyclosporine	214
C- Les anticorps anti-CyPB	214
1- Les anticorps polyclonaux	214
2- Les anticorps monoclonaux	215
D- Les lignées cellulaires	215
<b>II- Préparation des ligands</b>	215
<b>III- Préparation des échantillons de sang</b>	216
A- Isolement des cellules totales (groupe UBC)	216
B- Isolement des cellules mononuclées (groupe UBC)	216
C- Isolement des cellules CyPB <sup>+</sup> et CyPB <sup>-</sup>	217
D- Isolement du plasma	218
<b>IV- Mise en évidence de la CyPB</b>	218
A- Dosage ELISA	218
B- Immunorévélation de la CyPB par Western Blot	218
<b>V- Etudes des interactions de la CyPB</b>	219
A- Fixation de la CyPB	219
1- A la surface des cellules	219
a. Cytofluorimétrie en flux	219
b. Ligand radioactifs	219
2- sur héparine-Sépharose	220
B- Compétition de fixation	220
1- A la surface des cellules	220
2- sur héparine-Sépharose	220
C- Internalisation	221
1- Incorporation de la CsA libre ou complexée	221
2- Endocytose de la CyPB ou du complexe	221
<b>VI- Etude des propriétés biologiques</b>	221
A- Flux calcique	221
B- Analyse des dérivés inositol-phosphates	222
C- Analyse de l'activité immunosuppressive	223

<b>VII- Analyses</b> .....	223
A- Mesure de la radioactivité .....	223
B- Mesure par cytofluorimétrie en flux .....	223
C- Analyses statistiques .....	224

## *Annexe*

---

Article 1 : Allain F., Denys A. & Spik G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16537-16540.

Article 2 : Allain F., Denys A. & Spik G. (1996) *Biochem. J.* **317**, 565-570.

Article 3 : Mariller C., Haendler B., Allain F., Denys A. & Spik. (1996) *Biochem. J.* **317**, 571-576.

Article 4 : Denys A., Allain F., Foxwell B. & Spik G. (1997) *Immunology* **91**, 609-617.

## RESUME

La cyclophiline B (CyPB) est une immunophiline qui fixe la cyclosporine (CsA), puissant immunosuppresseur utilisé dans la prévention des rejets de greffe. Décrite comme une protéine résidente du réticulum endoplasmique, elle a également été caractérisée dans le lait et le plasma humain. Afin de comprendre les rôles de la CyPB extracellulaire, nous avons étudié ses propriétés de fixation à la surface des cellules T et son rôle potentiel dans l'activité immunosuppressive de la CsA. Nous avons mis en évidence une fixation spécifique et réversible, avec un Kd de l'ordre de 12 nM. Les sites de fixation se distribuent entre les différentes sous-populations lymphocytaires, avec une préférence pour les cellules CD4<sup>+</sup>. L'étude des propriétés de ces derniers nous a permis de distinguer deux types de sites, l'un de nature glycosaminoglycane (GAG) de type héparine et l'autre de nature protéique. Les premiers, majoritaires, interagissent avec l'extrémité basique N-terminale spécifique de la CyPB. Les seconds semblent reconnaître la CyPB par l'intermédiaire de la région conservée des CyPs qui contient le site catalytique, cette fixation étant inhibée en présence de CsA. A 37°C, la CyPB fixée à la surface des lymphocytes induit un flux calcique et est ensuite endocytée dans la cellule, puis dégradée. La CsA inhibe la génération du flux calcique, suggérant l'implication du récepteur protéique dans ce phénomène. Par contre, la fixation de la CyPB sur les sites GAG n'est pas bloquée en présence de l'immunosuppresseur et le complexe CyPB/CsA peut se fixer à la surface des lymphocytes par l'intermédiaire de ces derniers. Ces interactions avec les sites GAG favorisent ainsi un ciblage du médicament et son incorporation spécifique dans les lymphocytes sensibles. De plus, la présence du complexe CyPB/CsA permet une meilleure activité immunosuppressive de la CsA, et réduit considérablement *in vitro* les variations inter-individuelles de sensibilité au médicament. Finalement, nous avons mesuré les concentrations plasmatiques de CyPB et observé une augmentation significative chez les patients traités à la CsA. Ces taux élevés sont favorables à la formation d'un complexe CyPB/CsA actif et à une activité immunosuppressive plus efficace du médicament.

## ABREVIATIONS

<b>Abu</b> : acide aminobutyrique	<b>NF-AT</b> : nuclear factor of activated T cell
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>NF-IL2</b> : nuclear factor of IL2
<b>ANT</b> : adenine nucleotide translocase	<b>NK-TR</b> : natural killer tumor recognition molecule
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>Nuc18</b> : nucléase de 18 kDa
<b>ATCA</b> : acide trichloracétique	<b>OPD</b> : o-phénylène diamine
<b>BSA</b> : bovine serum albumine	<b>PAGE</b> : polyacrylamide gel electrophoresis
<b>CaM</b> : calmoduline	<b>PBL</b> : peripheral blood lymphocyte
<b>CaMKII</b> : CaM kinase II	<b>PBMC</b> : peripheral blood mononuclear cell
<b>CAML</b> : calcium signal modulating cyclophilin ligand	<b>PBS</b> : phosphate buffered saline
<b>CD</b> : cluster of differentiation	<b>Pgp</b> : P-glycoprotéine
<b>CD28RC</b> : CD28 responsive element	<b>pHi</b> : pH isoélectrique
<b>CI<sub>50</sub></b> : concentration inhibitrice à 50 %	<b>PIP2, PIP3, PIP4</b> : phosphatidyl-inositol di-, tri-, tetra-phosphates
<b>CMH</b> : complexe majeur d'histocompatibilité	<b>PKA, PKC</b> : protéine kinase A, C
<b>CnA, CnB</b> : calcineurine A, B	<b>PLC</b> : phospholipase C
<b>CRC</b> : calcium released channel	<b>PMA</b> : phorbol myristate acetate
<b>CS-A, CS-B, CS-C</b> : chondroïtane A, B, C	<b>PP1, PP2A, PP2B, PP2C</b> : protéine phosphatase 1, 2A, 2B, 2C
<b>CsA, CsG, CsH</b> : cyclosporine A, G, H	<b>PPIase</b> : peptidyl prolyl <i>cis-trans</i> isomérase
<b>CyCAP</b> : cyclophilin C associated protein	<b>PR</b> : polyarthrite rhumatoïde
<b>CyP, CyPA, CyPB, CyPC, CyPD</b> : cyclophiline A, B, C, D	<b>PTK</b> : protéine tyrosine kinase
<b>DAB</b> : diaminobenzidine	<b>RAFT</b> : rapamycin and FKBP12 target
<b>DAG</b> : diacylglycérol	<b>Rh1, Rh2</b> : rhodopsine 1, 2
<b>DI<sub>50</sub></b> : dose inhibitrice à 50%	<b>RMN</b> : résonance magnétique nucléaire
<b>DPBS</b> : Dulbecco's phosphate buffered saline	<b>RNase</b> : ribonucléase
<b>DMF</b> : diméthyl formamide	<b>RyR</b> : ryanodine receptor
<b>DMSO</b> : diméthyl sulfoxyde	<b>Sar</b> : sarcosine
<b>EGF</b> : epidermal growth factor	<b>SCYLP</b> : secreted cyclophilin-like protein
<b>FGF</b> : fibroblast growth factor	<b>SDS</b> : sodium dodecyl sulfate
<b>FITC</b> : fluorescein isothiocyanate	<b>SIP</b> : superinducible protein
<b>FKBP</b> : FK506 binding protein	<b>s-Le<sup>x</sup></b> : sialyl Lewis x
<b>ΔFMV</b> : variation of fluorescence mean value	<b>TCR</b> : T-cell receptor
<b>FPLC</b> : fast protein liquid chromatography	

<b>FRAP</b> :FKBP12-rapamycin associated protein	<b>TGF</b> : transforming growth factor
<b>GAG</b> : glycosaminoglycane	<b>TNF</b> : tumor necrosing factor
<b>GM-CSF</b> : granulocyte-macrophage colony stimulating factor	<b>TOR</b> : target of rapamycin
<b>GST</b> : glutathion-S-transferase	<b>TPR</b> : tetratricopeptide
<b>HDL</b> : high density lipoprotein	<b>UBC</b> : unfractionated blood cells
<b>HLA</b> : human leukocyte antigen	<b>VIH</b> : virus de l'immunodéficience acquise
<b>HS</b> : héparane sulfate	<b>VLDL</b> : very low density lipoprotein
<b>Hsp</b> : heat shock protein	<b>ZAP</b> : zeta associated protein
<b>HSPG</b> : heparan sulfate proteoglycane	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> : interferon gamma	<b>Acides aminés :</b>
<b>IgG, IgM</b> : immunoglobuline G, M	<b>A (Ala)</b> : alanine
<b>IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8</b> : interleukine 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8	<b>C (Cys)</b> : cystéine
<b>IP</b> : inositol phosphate	<b>D (Asp)</b> : acide aspartique
<b>IP1, IP2, IP3</b> : inositol mono-, di, tri-phosphate	<b>E (Glu)</b> : acide glutamique
<b>IP3-R</b> : IP3 receptor	<b>F (Phe)</b> : phénylalanine
<b>IPTG</b> : isopropyl thio-galactoside	<b>G (Gly)</b> : glycine
<b>KLH</b> : keyhole limpet hemocyanin	<b>H (His)</b> : histidine
<b>Lc</b> : lymphocyte	<b>I (Ile)</b> : isoleucine
<b>LDL</b> : low density lipoprotein	<b>K (Lys)</b> : lysine
<b>Lf</b> : lactoferrine	<b>L (Leu)</b> : leucine
<b>LPS</b> : lipopolysaccharide	<b>M (Met)</b> : méthionine
<b>MAP</b> : mitogen activated protein	<b>N (Asn)</b> : asparagine
<b>MDR</b> : multidrug resistance	<b>P (Pro)</b> : proline
<b>MeBmt</b> : butenyl-N-dimethyl thréonine	<b>Q (Gln)</b> : glutamine
<b>MIP</b> : macrophage inflammatory protein	<b>R (Arg)</b> : arginine
<b>MM</b> : masse molaire	<b>S (Ser)</b> : sérine
<b>MPT</b> : mitochondrial permeability transition pore	<b>T (Thr)</b> : thréonine
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b> : nuclear factor of $\kappa$ B	<b>V (Val)</b> : valine
	<b>W (Trp)</b> : tryptophane
	<b>Y (Tyr)</b> : tyrosine

# *Introduction*

---

Les cyclophilines (CyPs) constituent une famille de protéines ubiquitaires très conservées. Elles possèdent une activité peptidylprolyl *cis-trans* isomérase (PPIase), et la capacité à fixer spécifiquement la cyclosporine (CsA), molécule couramment utilisée en clinique dans la prévention du rejet de greffe et dans le traitement de certaines maladies auto-immunes. Toutefois, ces propriétés ne sont pas exclusives aux CyPs. En effet, une seconde famille de protéines, les FKBP (FK506 binding protein), possède les mêmes propriétés enzymatique et de fixation d'immunosuppresseurs. Cette dernière propriété a valeur aux CyPs et aux FKBP d'être réunies sous le terme plus général d'immunophilines.

Chez l'Homme, les différentes isoformes de CyPs occupent tous les compartiments cellulaires et extracellulaires. La CyPA est l'isoforme la plus abondante et la formation du complexe CyPA/CsA est à l'origine de l'activité immunosuppressive du médicament. Complexée à son récepteur intracellulaire, la CsA inhibe l'activité phosphatase de la calcineurine, enzyme clé de l'activation des lymphocytes T auxiliaires. Au Laboratoire, une autre isoforme a été isolée pour la première fois du lait humain puis caractérisée dans le plasma. Cette protéine a été identifiée à la CyPB, isoforme déjà décrite dans la littérature comme résidente du réticulum endoplasmique.

En transplantation d'organe, la sensibilité à la CsA est un point crucial pour le maintien de la greffe. Cependant, des variations interindividuelles de sensibilité au traitement sont observées en clinique et *in vitro*. Ainsi, en raison de sa localisation plasmatique, la CyPB pourrait intervenir dans ce phénomène en modifiant la disponibilité du médicament pour les cellules sensibles.

Nos travaux ont donc consisté en l'étude de la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T et de son rôle potentiel dans l'activité immunosuppressive de la CsA. Nous avons ainsi mis en évidence la fixation de la CyPB à la surface de cellules T de lignées lymphoblastiques humaines. La CyPB se fixe spécifiquement à la surface de ces cellules par l'intermédiaire de son extrémité N-terminale spécifique. Cependant, l'inhibition de la fixation par le peptide N-terminal n'est pas totale, ce qui suggère l'intervention d'une seconde région de la CyPB dans la fixation de la protéine à la surface des cellules. De plus, la protéine est endocytée à 37°C mais la quantité internalisée ne représente que 20% du ligand fixé, suggérant l'existence d'un second site membranaire non internalisé. Nous avons alors étudié la nature et les propriétés des sites de fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes circulants. Par cytofluorimétrie en flux, nous avons montré que la CyPB se fixe

spécifiquement sur les cellules CD3<sup>+</sup>. La fixation de la protéine est hétérogène et se distribue entre les différentes sous-populations lymphocytaires avec une préférence pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. De plus, les lymphocytes activés fixent la CyPB avec une moins grande capacité par rapport aux lymphocytes quiescents. Par l'utilisation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB, nous avons déterminé ses paramètres de fixation sur les lymphocytes T circulants. Ainsi, la constante d'affinité de la CyPB pour ces récepteurs est similaire à celle déjà mesurée avec les cellules Jurkat et ne varie pas au cours de l'activation. Par contre, nous avons confirmé que le nombre de site de fixation est très variable selon les individus et diminue de moitié sur les lymphocytes activés.

L'hétérogénéité interindividuelle de la fixation de la CyPB semble être due à l'expression variable des sites de fixation de la protéine à la surface des cellules. Nous avons alors étudié la nature des sites de fixation pour la CyPB et caractérisé deux classes de récepteurs membranaires de nature différente : des sites glycaniques sensibles à la force ionique et des sites non glycaniques sensibles à pH acide. Après avoir vérifié l'interaction de la CyPB et du complexe CyPB/CsA avec l'héparine, nous avons montré que la protéine se fixe en grande partie à la surface des cellules par l'intermédiaire des sites glycaniques sulfatés. Ces sites représentent près de 70% des sites totaux et reconnaissent le peptide N-terminal basique de la CyPB. Par contre, les autres sites de fixation correspondent à des récepteurs de nature protéique, et sont inhibés en présence de CsA. Alors que les sites glycaniques n'interviennent pas dans l'endocytose de la protéine, les sites non glycaniques permettent l'internalisation du ligand, et induisent en présence de CyPB un influx calcique d'origine membranaire. Toutefois, nous avons également montré que les sites glycaniques sulfatés permettent la fixation du complexe CyPB/CsA. Une fois complexée à la membrane par l'intermédiaire de la CyPB, la CsA est incorporée et s'accumule dans la cellule.

Nous avons alors étudié l'influence de la CyPB dans l'activité immunosuppressive de la CsA. La CsA libre, molécule lipophile, pénètre dans toutes les cellules par simple diffusion. Par contre, en présence de CyPB, nous avons observé que la CsA est ciblée préférentiellement vers les lymphocytes, et que sa distribution entre les différents compartiments du sang est modifiée. Ces résultats suggèrent l'intervention d'un mécanisme spécifique d'internalisation de la CsA complexée dans les lymphocytes T. De plus, nous avons montré que le complexe CyPB/CsA présente une meilleure activité immunosuppressive que la CsA seule. Cette amélioration peut s'expliquer par un ciblage du médicament vers les cellules fixant la CyPB.

En effet, les cellules exprimant les récepteurs de la CyPB s'avèrent être plus sensibles à la CsA complexée que les cellules ne fixant pas la protéine. De plus, lorsque les lymphocytes T sont en mélange avec les autres cellules du sang, le complexe CyPB/CsA favorise toujours le pouvoir anti-prolifératif du médicament. Enfin, nous avons constaté que l'hétérogénéité interindividuelle de sensibilité à la CsA est fortement réduite lorsque les lymphocytes sont traités avec le complexe CyPB/CsA, ce qui suggère que la CyPB joue un rôle important dans la sensibilité au médicament. Afin de savoir si les effets du complexe CyPB/CsA mesurés *in vitro* correspondaient aux concentrations de CyPB chez les patients traités à la CsA, nous avons dosé la CyPB dans le plasma de ces derniers. Ainsi, nous avons observé une augmentation de la concentration en CyPB plasmatique chez ces individus. Ces taux plus élevés de CyPB seraient favorables à la fixation du complexe sur les lymphocytes et à l'activité immunosuppressive de la CsA complexée dans le sang total.

Ces différents travaux nous ont permis de mettre en évidence l'existence de deux sites de fixation pour la CyPB à la surface des lymphocytes T circulants. Ainsi, les sites non glycaniques minoritaires permettent l'endocytose et la transduction du signal de la CyPB, suggérant leur implication dans la fonction biologique de la protéine. Par sa capacité à se fixer à l'héparine ainsi qu'à des sites membranaires de nature glycaniques sulfatée, la CyPB pourrait être considérée comme un nouveau membre de la famille des HBP (*heparin binding proteins*). Ces sites glycaniques permettent le stockage de la protéine et du complexe CyPB/CsA à la surface des lymphocytes T et par conséquent, le ciblage spécifique de la CsA complexée vers ces cellules. De plus, ces interactions favorisent une meilleure activité immunosuppressive de la CsA, suggérant que la CyPB circulante pourrait contribuer à une meilleure efficacité du médicament.

Une partie de ces travaux a fait l'objet des publications et communications suivantes :

## PUBLICATIONS

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

**Fabrice Allain, Agnès Denys and Geneviève Spik.** (1996) Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through the specific binding of complexed drug to cell surface. *Biochem. J.* **317**, 565-570.

**Christophe Mariller, Bernard Haendler, Fabrice Allain, Agnès Denys and Geneviève Spik.** (1996) Involvement of the N-terminal part of cyclophilin B in the interaction with specific Jurkat T-cell binding sites. *Biochem. J.* **317**, 571-576.

**Agnès Denys, Fabrice Allain, Brian Foxwell and Geneviève Spik.** (1997) Distribution of cyclophilin B binding sites in the subsets of human peripheral blood lymphocytes. *Immunology* **91**, 609-617.

**Agnès Denys, Fabrice Allain, Eric Masy, Jean-Paul Dessaint and Geneviève Spik.** Enhancing effects of secreted cyclophilin B on immunosuppressive activity of cyclosporin A. *Transplantation* (sous presse).

## COMMUNICATIONS

- Orale

**Agnès Denys, Fabrice Allain et Geneviève Spik.** *Distribution du récepteur de la Cyclophiline B à la surface des sous-populations lymphocytaires.* Colloque ULB-Lille, 9 Janvier 1997, Bruxelles, Belgique.

- Par affiche

**Fabrice Allain, Agnès Denys et Geneviève 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 de Biologie Moléculaire, Regard sur les protéines, 7-10 Juin 1994, Marseille et XXI<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et en Biologie Moléculaire, 5-8 Juillet, 1994, Reims, France.

**Agnès Denys, Fabrice Allain et Geneviève Spik.** *Fixation et endocytose du complexe Cyclophiline B / Cyclosporine A dans les lymphocytes T.* XXII<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et en Biologie Moléculaire, 4-7 Juillet 1995, Grenoble, France.

**Christophe Mariller, Fabrice Allain, Agnès Denys et Geneviève Spik.** *Caractérisation du site d'interaction de la Cyclophiline B avec son récepteur.* XXII<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et en Biologie Moléculaire, 4-7 Juillet 1995, Grenoble, France.

**Fabrice Allain, Agnès Denys and Geneviève Spik.** *Cyclophilin B binding to human peripheral blood T lymphocytes mediated specific internalization of complexed Cyclosporin A.* 23rd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS), 13-18 Août 1995, Bâle, Suisse.

**Agnès Denys, Fabrice Allain et Geneviève Spik.** *Distribution du récepteur de la Cyclophiline B à la surface des sous-populations lymphocytaires.* XXIII<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et en Biologie Moléculaire, 2-5 Juillet 1996, Poitiers, France.

**Fabrice Allain, Agnès Denys, Christophe Mariller and Geneviève Spik.** *The Cyclophilin B receptor.* Colloque *Cyclophilin Structure and Function*, 10-12 octobre 1996, Lille, France.

**Christophe Mariller, Mathieu Carpentier, Fabrice Allain, Bernard Haendler, Agnès Denys and Geneviève Spik.** *Cyclophilin B : secretion in human milk and interaction with the lymphocyte receptor.* Colloque *Cyclophilin Structure and Function*, 10-12 octobre 1996, Lille, France.

Une partie de ces travaux a été réalisée 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 forment deux familles de protéines qui possèdent une activité peptidylprolyl *cis-trans* isomérase (PPIase). Ces PPIases sont des protéines ubiquitaires très conservées au cours de l'évolution avec une distribution phylogénétique divergente. Elles sont retrouvées dans une large variété d'organismes procaryotes et eucaryotes. Chez les vertébrés, ces protéines multifonctionnelles sont présentes et abondantes dans tous les tissus et dans tous les types de cellules. Elles occupent la majorité des compartiments subcellulaires, sous forme libre ou liée aux membranes.

Le repliement, l'assemblage et le trafic de protéines dans la cellule sont régulés par des PPIases. Ces enzymes accélèrent le repliement de protéines *in vitro* ; elles ont la capacité à se lier à des protéines et agissent comme chaperones. D'autres PPIases co-régulent des complexes moléculaires incluant des *heat shock* protéines (hsp), des récepteurs à glucocorticoïdes et des canaux ioniques. Des formes sécrétées de PPIases sont des agents chimiotactiques et inflammatoires pour les monocytes, les éosinophiles et les basophiles.

Les immunosuppresseurs, CsA, FK506 et rapamycine se lient aux PPIases avec des affinités variables d'où le terme d'immunophiline. Ce critère de fixation a permis de classer les immunophilines en deux familles de protéines : les cyclophilines (CyPs, CsA-binding proteins) et les FKBP (FK506-binding proteins) (Galat, 1993 ; Ryffel, 1993 ; Kay, 1996).

Au cours des chapitres suivants, nous décrirons les connaissances actuelles concernant ces deux familles d'immunophilines, en nous limitant à la description structurale et fonctionnelle de ces protéines chez les vertébrés.

# LES IMMUNOPHILINES

## I- LES DIFFERENTES FAMILLES DES IMMUNOPHILINES

### A- Les Cyclophilines

Chez les mammifères, les masses moléculaires des cyclophilines vont de 18 à 150 kDa, leur pHi est souvent basique excepté pour la CyP40 qui existe sous deux formes de pHi acides. Les CyPs de mammifères sont codées par des gènes de localisation génomique différente, contrairement aux cyclophilines cytosolique et mitochondriale de *Neurospora crassa* qui dérivent d'un même gène et résultent d'un épissage alternatif (Tropschug *et al.*, 1988).

#### 1- Les formes majeures

##### *a. La Cyclophiline A*

Handschumacher *et al.* (1984) ont purifié à partir de thymocytes de boeuf, la première protéine fixant la CsA, nommée cyclophiline A (CyPA) et en ont déterminé la séquence N-terminale. Sa séquence complète en acides aminés et le clonage de son ADNc ont été décrits chez plusieurs espèces (Harding *et al.*, 1986 ; Tropschug *et al.*, 1988 ; Haendler *et al.*, 1989). Chez l'Homme, la CyPA a été clonée à partir d'une banque d'ADNc de cellules de la lignée lymphoblastique T Jurkat, ce qui 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). Il existe au moins 20 gènes apparentés, mais celui de la CyPA n'est représenté que par une seule copie et possède une structure formée de 5 exons et 4 introns (Haendler & Hofer, 1990).

La CyPA a été identifiée comme étant une peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase (PPIase). En effet, Fischer *et al.* ainsi que Takahashi *et al.* (1989) ont montré une homologie de séquence et une activité commune pour la fixation de la CsA entre la CyPA et la PPIase de 18 kDa précédemment isolée à partir de rein de porc par Fischer *et al.* (1984).

La CyPA de 165 résidus d'acides aminés est une protéine ubiquitaire, de 18 kDa. Elle est présente sous deux isoformes de pHi 8,6 pour la forme majeure et 6,8 pour la forme mineure.

L'utilisation d'anticorps anti-CyPA avait permis, par immunofluorescence et par microscopie électronique, de localiser la CyPA dans le compartiment cytosolique, mais également associée à la mitochondrie, au réticulum endoplasmique, à l'appareil de Golgi et à

la membrane nucléaire (Sarris *et al.*, 1992 ; McDonald *et al.*, 1992 ; Azhderian *et al.*, 1993). Des travaux plus récents indiquent cependant que les CyPs associées aux membranes intracellulaires sont toutes de masse moléculaire supérieure à 18 kDa et correspondent à d'autres isoformes. De plus, selon les travaux de Ryffel *et al.* (1991), la CyPA se trouve également dans le noyau, contrairement aux travaux de McDonald *et al.* (1992) et de Azhderian *et al.* (1993) qui ne détectent aucune trace de CyPA dans ce compartiment. Toutefois, 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 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). Ces résultats ont été depuis contredits par les travaux d'Allain *et al.* (1995) qui ont mis en évidence la présence de CyPB dans le plasma et non de CyPA. Ces différentes localisations erronées de la CyPA peuvent s'expliquer par le manque de spécificité des anticorps dirigés contre la CyPA, qui réagissent avec d'autres isoformes formées d'un noyau commun avec la CyPA et présentes dans ces compartiments. Récemment, la CyPA a été caractérisée par son activité PPIase dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Billich *et al.*, 1997). Cette localisation a été confirmée par immunorévélation et par séquençage de son extrémité N-terminale. Par hybridation *in situ*, le gène de la CyPA a été localisé au niveau de la bande 7p13 (Braaten *et al.*, 1996a).

La CyPA est présente dans tous les tissus, à des concentrations variables et représente 0,1 à 0,4% des protéines cellulaires. Elle est particulièrement abondante dans le cerveau, les reins, les parotides et les cellules du sang (Ryffel *et al.*, 1991 ; Marks *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995). De plus, le taux de CyPA dépend de l'état de la cellule :

- Dans les fibroblastes de la lignée 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 et les cellules souches érythroïdes et myéloblastiques présentent respectivement un taux de CyPA beaucoup plus important que les cellules quiescentes, les érythrocytes et les granulocytes matures (Sarris *et al.*, 1992). De même, les tissus néoplasiques renferment un taux plus élevé que dans les tissus sains (Koletsky *et al.*, 1986).

- Dans les lymphocytes stimulés par la concanavaline A, le taux d'ARNm de la CyPA augmente. Cette augmentation est inhibée par l'acide okadaïque, inhibiteur spécifique des

protéines phosphatases PP1 et PP2A, ce qui suggère que l'expression de la CyPA est régulée par ces deux enzymes (Richards *et al.*, 1992). Cette augmentation n'est pas retrouvée en cas d'activation des lymphocytes T par les esters de phorbol ou la phytohémagglutinine (Haendler *et al.*, 1987).

- Après administration de CsA, la concentration cellulaire en CyPA augmente dans chaque tissu examiné, à l'exception du cerveau (Sarris *et al.*, 1992 ; McDonald *et al.*, 1992).

La structure très conservée de la CyPA fait que cette protéine génère difficilement des anticorps. Cependant, certains auteurs ont montré la présence d'auto-anticorps dirigés contre la CyPA 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 (Kratz *et al.*, 1992 ; Harigai *et al.*, 1992). Ces auto-anticorps de classe IgG et IgM n'inhibent pas l'activité PPIase de la CyPA, ce qui suggère qu'ils reconnaissent un épitope différent du site catalytique. De plus, ils réagissent préférentiellement avec la forme dénaturée de la protéine. Le mécanisme responsable de l'apparition de ces auto-anticorps reste obscur. Le mimétisme moléculaire a été proposé comme étant le mécanisme initial de l'auto-immunité. Le système immunitaire répondant à un épitope d'un micro-organisme qui infecte l'hôte, reconnaît ce même épitope, présent sur une protéine de l'hôte. Ainsi, il a été montré que les auto-anticorps liant la CyPA reconnaissent des antigènes d'un organisme étranger, le *Mycobacterium Leprae* (Kratz *et al.*, 1992) et réagissent avec la PPIase de la levure (Harigai *et al.*, 1992), suggérant une possible réaction croisée.

#### *b. La Cyclophiline B*

Par criblage de banques d'ADNc (de cellules Jurkat, de thymus humain et murin, de cellules de foie) avec des sondes construites à partir de la séquence conservée des CyPs (Price *et al.*, 1991 ; Bergsma *et al.*, 1991 ; Hasel *et al.*, 1991) et par purification de la protéine dans des liquides biologiques (Caroni *et al.*, 1991 ; Spik *et al.*, 1991), plusieurs auteurs ont décrit une deuxième CyP, la cyclophiline B (CyPB) distincte de la CyPA. La CyPB de 184 résidus d'acides aminés est une protéine de 21 kDa avec un pHi supérieur à 9,5. Son ARNm de 1kb 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 ; Spik *et al.*, 1991 ; Caroni *et al.*, 1991). La CyPB humaine possède 65% d'homologies avec la CyPA mais se distingue par la présence d'extrémités N- et C-terminales spécifiques.

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).

La répartition tissulaire de la CyPB est ubiquitaire. 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).

Par fractionnement subcellulaire, la CyPB a été exclusivement localisée dans le réticulum endoplasmique et non retrouvée dans le cytosol (Hasel *et al.*, 1991). Ces observations sont en accord avec la présence d'un peptide signal. L'utilisation d'anticorps anti-CyPB en microscopie de fluorescence a permis de préciser sa localisation subcellulaire. Le signal obtenu est limité à certaines vésicules du réticulum endoplasmique (Arber *et al.*, 1992). Il montre que la CyPB est colocalisée avec la calréticuline (protéine fixant le  $\text{Ca}^{2+}$ ) dans des vésicules appelées calciosomes s'accumulant autour du noyau. Dans les plaquettes activées, la CyPB est colocalisée avec la calréticuline dans le réseau tubulaire dense, lieu de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  de ces cellules. Dans les cellules des muscles striés, la CyPB est présente dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique avec la calséquestrine. Dans les cellules adhérentes, la CyPB s'accumule avec la calréticuline dans les pseudopodes.

Toutefois, la CyPB ne contient ni la séquence KDEL, connue pour assurer la rétention des protéines dans la voie de sécrétion (Munro & Pelham, 1987), ni de domaine transmembranaire. Ce qui soulève la question du mode de rétention de la CyPB dans le réticulum endoplasmique. Selon Arber *et al.* (1992) la CyPB est retenue par son extrémité C-terminale VEKPFAlAKE dans les calciosomes. En effet, le remplacement de la séquence C-terminale de la nexine, protéine habituellement sécrétée, par celle de la CyPB conduit à sa colocalisation avec la CyPB endogène (Arber *et al.*, 1992). Outre cette localisation dans les vésicules dérivées du réticulum endoplasmique, la CyPB a été récemment décrite tout le long de la voie de sécrétion jusqu'à sa libération dans le milieu extracellulaire. De plus, la CsA provoquerait le relargage massif et rapide de la CyPB des fibroblastes vers le milieu extracellulaire, 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 ; Smith *et al.*, 1995). Parallèlement, Caroni *et al.* (1991) et Spik *et al.* (1991) ont décrit respectivement des isoformes de CyPB sécrétées, la "s-cylophilin" de Poulet et la SCYLP (*secreted cyclophilin-like protein*) isolée du lait de Femme. L'analyse comparée par spectroscopie de masse révèle que la CyPB sécrétée dans le lait humain présente une masse

moléculaire plus faible que celle de la protéine recombinante. Cette différence s'explique par l'absence des 5 acides aminés C-terminaux AIAKE. Ces résultats suggèrent que la séquence de rétention de la CyPB dans le réticulum endoplasmique peut se limiter à ces 5 acides aminés (Mariller *et al.*, 1996a). De plus, des anticorps spécifiques de la CyPB, dirigés contre ses extrémités N- et C-terminales spécifiques, ont permis de doser cette isoforme dans le plasma humain à une concentration moyenne de  $150 \pm 80$  ng/ml (Allain *et al.*, 1995).

### *c. La Cyclophiline C*

La CyPC a été clonée pour la première fois à partir d'une banque d'ADNc de souris. C'est une protéine de 212 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire de 23 kDa et un pHi de 7,4. De part et d'autre de la région commune aux CyPs, la CyPC possède des extrémités N- et C-terminales qui sont spécifiques. Comme pour la CyPB, la séquence N-terminale de la CyPC déduite à partir de l'ADNc est riche en acides aminés hydrophobes caractéristiques d'un peptide signal dirigeant la protéine vers le réticulum endoplasmique (Friedman & Weissman, 1991).

La CyPC de souris a une distribution tissulaire restreinte. Son ARNm est exprimé abondamment dans le rein, faiblement dans les cellules T, et semble absente des autres tissus testés (Friedman & Weissman, 1991). Plus précisément, la CyPC murine est essentiellement localisée au niveau des tubules proximaux, contrairement à la CyPA qui est distribuée en quantité égale dans tout le néphron. Après traitement à la CsA, l'expression de la CyPC est augmentée, ce qui suggère que cette CyP peut intervenir dans les phénomènes de néphrotoxicité liés à ce médicament (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 formée de 212 résidus d'acides aminés et partage 90% d'homologie avec son homologue murine et respectivement 70% et 48% d'homologie avec la CyPB et la CyPA humaine. Contrairement à la CyPC murine, la CyPC humaine est exprimée dans tous les tissus testés mais en quantité moins importante que la CyPA, à un taux environ 10 fois inférieur. De plus, son expression dans le rein est significativement moins élevée que dans le foie, le poumon, le pancréas, le muscle et le coeur, ce qui est contradictoire avec le rôle proposé pour la CyPC murine dans la néphrotoxicité. Par contre, elle est peu représentée dans le cerveau et les cellules T Jurkat (Schneider *et al.*, 1994).

#### *d. La Cyclophiline D*

Le criblage de banques d'ADNc issues de cellules de la lignée T Jurkat et d'hépatocytes humains avec l'ADNc de la CyPA (hCyp1) dans des conditions de faible stringence, a permis de caractériser, en dehors de la CyPB (hCyp2), une troisième CyP nommée hCyp3. Son ARNm code pour une protéine de 207 acides aminés. La hCyp3 partage 76% et 62% d'homologie de séquence respectivement avec la CyPA et la CyPB. Comme la CyPB, la hCyp3 possède un peptide signal de 42 résidus d'acides aminés qui dirige la protéine vers des structures membranaires intracellulaires. Elle est d'ailleurs retrouvée associée à des organites intracellulaires après fractionnement cellulaire (Bergsma *et al.*, 1991). Cependant, l'analyse par immunorévélation révèle une forme prédominante de la hCyp3 avec une masse moléculaire de 18 kDa, masse inférieure de 4 kDa à celle prédite à partir de l'ADNc (22 kDa). Cette différence de masse s'explique par la perte des acides aminés du peptide signal situés à l'extrémité N-terminale de la protéine. Cette CyP est exprimée dans tous les tissus testés à des taux 50 à 100 fois inférieurs à ceux de la CyPA. Au cours de l'activation des lymphocytes T, le taux d'expression de la hCyp3 n'est pas affectée comme celui de la CyPA et de la CyPB. Le gène de la CyPD est également représenté en copie unique dans le génome humain (Bergsma *et al.*, 1991).

Une protéine d'environ 18 kDa et présentant une activité PPIase inhibée par la CsA a été purifiée à partir de la matrice mitochondriale de cellules de coeur et de foie de rat. Le séquençage de l'extrémité N-terminale révèle de fortes homologies avec la hCyp3 (Connem & Halestrap, 1992 ; Inoue *et al.*, 1993). L'identification de la hCyp3 avec la CyPD a été finalement confirmée par les travaux de Woodfield *et al.* (1997) qui ont cloné l'ADNc de la CyPD de rat.

#### *e. La Cyclophiline 40*

Par chromatographie d'affinité sur colonne de CsA immobilisée, la CyP40 a été purifiée pour la première fois à partir d'homogénat de cerveau de veau. C'est une protéine cytosolique, représentée par 2 isoformes de pHi 5,3 et 5,5, différents des pHi basiques de la CyPA (Kieffer *et al.*, 1992). La CyP40 humaine a été clonée à partir d'une banque d'ADNc de cellules pancréatiques. Le domaine N-terminal de la CyP40 présente 64% d'homologie avec la CyPA et possède une activité PPIase inhibée par la CsA, tandis que le domaine C-terminal partage 30 % d'homologie avec la p59 (ou FKBP52), constituant du complexe récepteur

hétéroooligomérique des stéroïdes (Kieffer *et al.*, 1993). Le gène de la CyP40 se situe sur le chromosome 4 et a une structure formée de 10 exons et 9 introns. L'organisation des exons codant pour la région homologue aux CyPs, n'est pas similaire à celle du gène de la CyPA, suggérant une divergence précoce dans l'évolution (Yokoi *et al.*, 1996 ; Ratajczak *et al.*, 1997).

La CyP40 et la FKBP52 contiennent toutes les deux dans leurs domaines C-terminaux trois unités répétées de tétratricopeptides (TPR) suivis d'un site potentiel de fixation pour la calmoduline (Ratajczak *et al.*, 1993). Ces deux protéines se lient à la hsp90, autre constituant de la forme inactive des récepteurs des stéroïdes, par leur domaine commun TPR C-terminal. Cette liaison n'est pas affectée en présence de CsA qui se fixe dans le site catalytique du domaine CyP N-terminal non impliqué dans la liaison avec la hsp90 (Hoffman & Handschumacher, 1995 ; Ratajczak & Carrello, 1996).

Comme les autres isoformes de CyPs, la CyP40 présente une localisation tissulaire ubiquitaire.

## 2- Les formes mineures

Outre les cinq CyPs majeures, d'autres protéines ont été décrites de façon ponctuelle comme ayant des homologies et des propriétés communes avec les CyPs.

### *a. La Cyclophiline 33*

Une nouvelle CyP nucléaire a été clonée à partir d'une banque de cellules T Jurkat. Cette CyP de 33 kDa (CyP33) est formée de deux domaines fonctionnels :

- un domaine N-terminal, typique de protéines se fixant à l'ARN,
- un domaine PPIase en position C-terminale présentant 40% d'homologie avec la CyPA.

Par immunorévélation, après fractionnement cellulaire, la CyP33 est retrouvée uniquement dans les fractions nucléaires soluble et membranaire. Dans la cellule, la CyP33 est représentée sous deux isoformes de 30 et 33 kDa. Seule l'isoforme de 33 kDa se fixe à l'ARN, avec une préférence pour les résidus adénine et uridine (Mi *et al.*, 1996).

### *b. Les autres Cyclophilines sécrétées*

D'autres CyPs sécrétées ont été caractérisées par homologie de séquence avec des CyPs connues.

Les fibroblastes 3T3 activés par le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) ou EGF (*Epidermal Growth Factor*) synthétisent et sécrètent en grande quantité 5 protéines appelées SIPs (*superinducible proteins*). Parmi ces protéines, on distingue la SIP12,5 et la SIP24, respectivement identifiées comme étant la  $\beta$ 2-microglobuline et une protéine présentant des homologies avec les CyPs. La séquence en acides aminés de 3 peptides issus de la SIP24 révèle une homologie significative avec la CyPA. De plus, la SIP24 est N-glycosylée et contient un ou plusieurs ponts disulfures intramoléculaires (Davis *et al.*, 1991).

Au cours de la purification de facteurs chimiotactiles pour les éosinophiles et synthétisés par l'utérus en réponse aux oestrogènes, Xu *et al.* (1992) ont isolé une protéine présentant une séquence N-terminale de 15 acides aminés identiques à celle de la CyPA de rat. Parallèlement, Sherry *et al.* (1992) ont purifié une protéine de 18 kDa, la sp18 (*secreted protein*) à partir du milieu de culture de macrophages murins stimulés *in vitro* par des lipopolysaccharides (LPS). L'analyse de la séquence N-terminale de la protéine et de fragments tryptiques révéla que la sp18 et la CyPA partagent de fortes homologies, bien que la CyPA ne possède pas de peptide signal de sécrétion.

### c. Les Cyclophilines membranaires

#### $\alpha$ - Le récepteur NK-TR des cellules NK

Un récepteur de reconnaissance des tumeurs exprimé par les cellules NK (*Natural Killer*) a été identifié par réaction avec un antisérum anti-idiotype dirigé contre un anticorps monoclonal reconnaissant les cibles des cellules NK. Cet anticorps monoclonal empêche la mort des cellules tumorales induite par les cellules NK (Frey *et al.*, 1991). L'anti-idiotype reconnaît des protéines de 80 et 150 kDa à la surface des cellules NK. Ces deux molécules sont impliquées dans la reconnaissance des cellules tumorales et sont couplées à la voie cytolytique. Anderson *et al.* (1993) ont ainsi nommé la protéine de 150 kDa NK-TR (*Natural Killer Cell Tumour Recognition*) en référence à son rôle présumé.

Le NK-TR a été cloné chez l'Homme et la souris. Il s'agit d'une protéine de 1403 acides aminés (MM=158 kDa) chez l'Homme et de 1460 acides aminés (MM=160 kDa) chez la souris. Les deux formes présentent 80% d'homologie de séquence. Le NK-TR est non glycosylé et est composé de plusieurs domaines distincts (Anderson *et al.*, 1993) :

- un domaine N-terminal hydrophobe transmembranaire,
- un domaine en position N-terminale homologue aux CyPs (50% d'homologie de séquence) et possédant une activité PPIase (Rinfret *et al.*, 1994)
- trois domaines riches en résidus sérine et arginine (domaines RS) retrouvés habituellement dans des protéines impliquées dans l'épissage d'ARNm,
- trois domaines homologues à la Nopp140, une phosphoprotéine nucléolaire de 140 kDa.

Le gène du NK-TR est représenté en copie unique dans le génome (Rinfret & Anderson, 1993 ; Simons-Evelyn *et al.*, 1997). Son ARNm est spécifiquement exprimé dans les cellules NK, il n'est pas présent dans les lymphocytes B, monocytes, plaquettes, thymocytes et la majorité de lymphocytes T (Anderson *et al.*, 1993).

Rinfret & Anderson (1993) ont décrit deux épissages alternatifs indépendants pour l'ARNm transcript à partir du gène du NK-TR. En effet, trois protéines peuvent être exprimées à partir de cet ARNm :

- une forme complète du NK-TR,
- une forme tronquée ne comprenant que le domaine transmembranaire et les 2/3 du domaine CyP,
- une forme délétée des 25 acides aminés adjacents au premier domaine chargé positivement.

L'interleukine 2 (IL2) est un puissant activateur de l'activité cytolytique des cellules NK et génère une population de cellules capables de lyser les cellules résistantes aux cellules NK, ainsi que les cellules cancéreuses. Au cours de l'activation des cellules NK par l'IL2, on observe une baisse de l'épissage conduisant à la forme tronquée du NK-TR, résultant en une nette augmentation de la production de la forme complète du NK-TR. La forme délétée de 25 acides aminés ne semble pas être sensible à l'IL2 (Rinfret & Anderson, 1993).

Récemment, Ortaldo *et al.* (1997) ont démontré que le NK-TR est nécessaire à la lyse indépendante du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules cancéreuses et des cellules infectées par un virus. De plus, une sous-population de lymphocytes T est caractérisée par une activité cytotoxique indépendante du TCR, appelée activité *NK-like*. Par l'utilisation de sondes anti-sens du gène *nk-tr*, l'activité cytotoxique de ces lymphocytes est abolie, ce qui suggère que la protéine NK-TR est associée à cette activité *NK-like* (Chambers *et al.*, 1994).

Récemment, Giardina *et al.* (1996) ont confirmé l'expression du NK-TR dans les cellules NK, mais ils ont également détecté cette protéine dans les monocytes activés et les

cellules de la lignée HL-60. Cette isoforme semble être impliquée dans la différenciation des monocytes. En effet, les monocytes stimulés par les LPS et l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) montrent un taux intracellulaire en protéine NK-TR plus important par rapport aux monocytes non activés. De même, le taux d'expression de NK-TR augmente consécutivement avec la différenciation des cellules HL-60 par le diméthyl sulfoxyde (DMSO) et le phorbol myristate acetate (PMA). La transfection d'anti-sens NK-TR dans les cellules HL-60 abolit leur différenciation par le DMSO, ce qui suggère que le NK-TR joue un rôle dans la différenciation des monocytes.

### $\beta$ - La RS-cyclophiline

Par la méthode du double hybride dans la levure, une nouvelle CyP de 89 kDa a été isolée à partir d'une banque d'ADNc de cellules T de souris. Elle est formée d'un domaine N-terminal homologue aux CyPs, de deux domaines Nopp140 et d'un large domaine RS. Cette protéine partage 39% d'homologie avec le NK-TR décrit par Anderson *et al.* (1993), alors que 70% des acides aminés sont identiques dans le domaine CyP. Malgré de faibles homologies dans la portion non-CyP de ces molécules, il y a toutefois conservation du type et de la localisation relative des différents domaines. La RS-CyP est présente à des taux similaires dans le poumon, foie, rein, intestin, testicule et cerveau. Elle est également présente dans les lymphocytes T, B et monocytes, mais pas dans les cellules NK, ce qui pourrait s'expliquer par la présence du NK-TR dans ces cellules (Nestel *et al.*, 1996).

### $\gamma$ - Le produit du gène Nina A

Le gène *NinaA* de *Drosophila melanogaster* code pour une protéine de 237 acides aminés qui partage 42% d'homologie de séquence avec la CyPA humaine. Les mutations affectant ce gène réduisent considérablement le taux de rhodopsine dans les cellules photoréceptrices (Schneuwly *et al.*, 1989 ; Shieh *et al.*, 1989).

La protéine Nina A est une protéine membranaire intégrale avec une séquence signal hydrophobe N-terminale clivable permettant sa translocation vers le réticulum endoplasmique et une séquence C-terminale hydrophobe conduisant à son ancrage dans la membrane. Nina A est une N-glycoprotéine dont la majorité de la molécule contenant le domaine CyP est dirigée dans la lumière du réticulum endoplasmique. Elle comporte également une courte queue cytosolique de sept acides aminés. Le gène *nina A* est exprimé exclusivement dans les cellules

photoréceptrices. Nina A est indispensable à la stabilité et au transport des rhodopsines Rh1 et Rh2 dans le photorécepteur R1-R6 de la drosophile.

Par immunorévélation avec des anticorps spécifiques de NinaA, une protéine de 30 kDa a été caractérisée dans la fraction membranaire isolée du cortex cérébral et de la rétine de boeuf. Cette protéine est abondante et présente une spécificité tissulaire. Bien que similaire à Nina A et associée aux membranes, elle ne possède cependant pas de point d'ancrage membranaire (Stamnes *et al.*, 1991).

Les caractéristiques structurales des principales CyPs des Vertébrés sont résumées dans le Tableau I p36. La comparaison de leur structure et les homologies des 4 isoformes majeures sont représentées dans les Figures 1 p30 et 2 p37.

## B- Les FKBP

Les masses moléculaires des différentes FKBP vont de 12 à 63 kDa et leur pHi est basique pour la majorité des FKBP eucaryotes. Comme les CyPs, les FKBP sont codées par des gènes distincts. Chez les mammifères, au moins cinq membres de la famille des FKBP ont été purifiés et caractérisés. La FKBP12, la FKBP12A et la FKBP13 contiennent seulement le domaine basique des FKBP, alors que la FKBP25 et la FKBP52 possèdent un ou plusieurs domaines FKBP (Callebaut *et al.*, 1992 ; Kay, 1996).

### 1- Les formes majeures

#### *a. La FKBP12*

Le premier récepteur pour les agents immunosuppresseurs FK506 et rapamycine a été identifié chez l'Homme comme une protéine distincte de la CyPA (Siekierka *et al.*, 1989a). Tout comme les différentes CyPs, cette protéine possède une activité PPIase (Siekierka *et al.*, 1989b ; Harding *et al.*, 1989). C'est une protéine de 108 acides aminés avec un pHi de 8,9 et une masse moléculaire de 11,8 kDa, d'où le terme de hFKBP12 (Maki *et al.*, 1990). Sa séquence peptidique ne présente aucune similitude avec celle des CyPs. Le gène codant pour la hFKBP12 est représenté en copie unique sur le chromosome 20 et est situé au niveau de la bande p13 (DiLella, 1991 ; DiLella *et al.*, 1992). Il est composé de 5 exons et s'étend sur 25 kb, distance considérable pour une protéine dont le séquence codante nécessite 0,3 kb (DiLella & Craig, 1991 ; Peattie *et al.*, 1994).



Figure 1 : Homologies de séquence entre les cyclophilines humaines majeures:

CyPA (Harding et al., 1986) ; CypB (Spik et al., 1991)

CyPC (Schneider et al., 1994) ; CyPD (Bergsma et al., 1992)

La FKBP12 est une protéine abondante et représente jusqu'à 0,4% des protéines cytoplasmiques totales dans les cellules Jurkat (Siekierka *et al.*, 1989a). Elle n'est pas limitée aux cellules lymphoïdes. Elle est présente dans le cytoplasme de toutes les cellules de mammifères étudiés, avec exceptionnellement des taux d'expression très élevés dans des régions spécifiques du cerveau, et à de très faibles concentrations dans les érythrocytes. (Harding *et al.*, 1989 ; Siekierka *et al.*, 1990 ; Maki *et al.*, 1990 ; Steiner *et al.*, 1992 ; Peattie *et al.*, 1994). La FKBP12 est exprimée dans tous les tissus et dans tous les types cellulaires. De même, des homologues de la FKBP12 ont été décrits dans d'autres espèces très différentes. Elles présentent de fortes homologies de séquence entre elles, montrant ainsi sa conservation au cours de l'évolution (Kay, 1996).

Bien que chez les mammifères, la majorité de la FKBP12 se trouve sous forme libre dans le cytoplasme, une faible proportion est associée avec d'autres protéines dans la fraction membranaire (Jayaraman *et al.*, 1992 ; Cameron *et al.*, 1995a ; Wang *et al.*, 1994) ou sécrétée dans le milieu extracellulaire (Bang *et al.*, 1995 ; Shirakata *et al.*, 1995).

#### *b. La FKBP13*

La FKBP13 a été purifiée pour la première fois à partir de thymus bovin sur une colonne de rapamycine (Jin *et al.*, 1991). L'ADNc de la FKBP13 code pour une protéine de 141 acides aminés contenant une séquence signal N-terminale de 21 acides aminés hydrophobes. La protéine mature de 120 acides aminés a une masse moléculaire de 13,2 kDa.

La séquence signal dirige la FKBP13 vers le réticulum endoplasmique. Cependant, aucune FKBP13 n'a été retrouvée sécrétée de la cellule. En effet, le térapeptide RTEL en position C-terminale suivant le domaine FKBP est suffisamment homologue à la séquence KDEL pour permettre sa rétention dans la lumière du compartiment pré-golgien du réticulum endoplasmique (Nigam *et al.*, 1993 ; Bush *et al.*, 1994). L'addition de FK506 n'a aucun effet sur la distribution de la FKBP13 entre les compartiments cellulaires.

Le gène de la FKBP13 composé de 6 exons est situé en copie unique sur le chromosome humain 11 (DiLella *et al.*, 1992 ; Hendrickson *et al.*, 1993). Ainsi le transcrit primaire est épissé pour donner un ARNm de 0,6 kb (Jin *et al.*, 1991).

Comme la FKBP12, la FKBP13 est largement exprimée dans tous les tissus étudiés de mammifères. Bien que normalement exprimée à un taux inférieur à celui de la FKBP12, elle peut être prédominante dans certaines cellules comme les mastocytes spécialisés dans la sécrétion de protéines et riche en réticulum endoplasmique (Hultsch *et al.*, 1991).

### c. La FKBP25

La FKBP25 a été identifiée pour la première fois à partir de cellules T humaines et de thymus de veau par sa capacité à être plus retenue sur une colonne de rapamycine que de FK506. Elle a alors été purifiée à partir d'homogénats de cerveau, thymus et rate de boeuf puis partiellement séquencée (Galat *et al.*, 1992). L'homologue humaine, hFKBP25, a été isolée à partir d'une banque d'ADNc et entièrement séquencée (Jin *et al.* 1992 ; Hung & Schreiber, 1992 ; Wiederrecht *et al.*, 1992). La localisation chromosomique du gène de la hFKBP25 n'a pas encore été décrite. Après épissage alternatif, l'ARNm fait 1,8 kb.

La FKBP25 migre en électrophorèse comme une protéine de 30 kDa, mais sa masse moléculaire calculée à partir de l'ADNc est de 25,2 kDa. Elle est composée de 215 résidus d'acides aminés. Le domaine hydrophile N-terminal a une structure en hélice- $\alpha$ . Le domaine FKBP C-terminal diffère des autres FKBP par la présence de séquences polylysines. En effet, la FKBP25 possède dans son domaine FKBP le motif KK(X)<sub>7</sub>KK(X)<sub>26</sub>KKKK. Celui-ci peut servir comme signal potentiel à une localisation nucléaire, unique à ce membre de la famille des FKBP (Galat *et al.*, 1992 ; Wiederrecht *et al.*, 1992). De plus, les cinq motifs KXXX présents dans le domaine N-terminal et la première section du domaine FKBP peut également contribuer à cette localisation (Jin *et al.*, 1992). Cette prédiction est confirmée par la démonstration que la FKBP25 est principalement localisée dans la fraction nucléaire des cellules T humaines et murines (Rivière *et al.*, 1993 ; Jin & Burakoff, 1993). Contrairement à la FKBP12, la FKBP25 se lie fortement à une colonne d'ADN-cellulose, et le domaine N-terminal forme un motif hélice-boucle-hélice amphipathique qui peut être responsable de cette affinité vis-à-vis de l'ADN (Rivière *et al.*, 1993). Ainsi, la nécessité de fortes concentrations en sels pour extraire la FKBP25 des tissus est compatible avec une association physiologique avec l'ADN. La FKBP25 de mammifère contient également des séquences consensus pour une phosphorylation par la caséine kinase II, protéine kinase présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme. La caséine kinase est transloquée du cytoplasme vers le noyau lors de l'activation cellulaire. Elle peut phosphoryler une variété de substrats cytoplasmiques et nucléaires, telle que la nucléoline, phosphoprotéine nucléaire de 100 kDa impliquée dans la régulation de la biogénèse du ribosome (Galat *et al.*, 1992 ; Jin & Burakoff, 1993).

#### *d. La FKBP52*

La FKBP52, identifiée comme partenaire de la hsp90, libre ou associée au récepteur stéroïdien (Tai *et al.*, 1986 ; Renoir *et al.*, 1990), est une protéine à multidomaine FKBP, également appelée p59, FKBP59, HBI ou encore Hsp56 (Pratt & Toft, 1997). L'existence d'une PPIase de haute masse moléculaire dans les cellules T humaines a été révélée pour la première fois par sa rétention sur une colonne d'affinité pour le FK506 et la rapamycine. La FKBP52 a été identifiée à une protéine déjà décrite faisant partie des complexes récepteurs libres de glucocorticoïdes, androgène, oestrogène et progestérone dans plusieurs tissus de mammifères (Tai *et al.*, 1986 ; Yem *et al.*, 1992 ; Lebeau *et al.*, 1992 ; Tai *et al.*, 1992). Le gène de la FKBP52 humaine code pour une protéine de 459 acides aminés (Peattie *et al.*, 1992). La FKBP52 contient 3 domaines FKBP séparés par de courtes séquences hydrophobes (Callebaut *et al.*, 1992). Seul le premier domaine FKBP fixe le FK506 (Chambraud *et al.*, 1993 ; Renoir *et al.*, 1994). Le troisième domaine FKBP est prolongé par trois TPR. Ces trois motifs TPR nécessaires à la fixation de la hsp90 (Radanyl *et al.*, 1994) sont organisés en deux courtes hélices- $\alpha$  amphipathiques (Ratajczak *et al.*, 1993). Du côté C-terminal, il existe une séquence consensus liant la calmoduline (Massol *et al.*, 1992). La FKBP52 est phosphorylée dans la cellule, et existe sous plusieurs isoformes avec différents pHi (Sanchez *et al.*, 1990 ; Tai *et al.*, 1992). Toutes ces isoformes fixent le FK506 (Ruff *et al.*, 1992). Cependant, il n'est pas encore décrit si ces différents états de phosphorylation sont corrélés avec les complexes de protéines associées à la FKBP52 ou avec sa localisation intracellulaire.

Par immunofluorescence, la FKBP52 est retrouvée en majorité dans le noyau, localisation différente à la hsp90 très majoritairement cytoplasmique, alors que les récepteurs stéroïdes sont nucléaires (Pratt & Toft, 1997). Toutefois, une minorité est colocalisée avec les microtubules dans le cytoplasme, de même qu'une fraction de hsp90 (Gasc *et al.*, 1990 ; Czar *et al.*, 1994). En présence de FK506, la localisation de la FKBP52 n'est pas modifiée (Perrot-Applanat *et al.*, 1995). Une très faible fraction de FKBP52 est trouvée libre dans les cellules alors que la majorité existe sous une forme complexée au récepteur des hormones stéroïdes constitué de la hsp90, hsp70 et d'autres protéines nécessaires pour maintenir le récepteur dans une conformation correcte à la fixation du stéroïde (Pratt & Toft, 1997). La FKBP52 et la Cyp40 ne sont jamais retrouvées simultanément associées aux récepteurs des stéroïdes (Renoir *et al.*, 1995 ; Owens-Grillo, 1995). Elles ont cependant une action complémentaire probablement dans le trafic de ces récepteurs (Czar *et al.*, 1995).

La FKBP52, traduite à partir d'un ARNm de 2,4 kb, est largement exprimée dans les tissus humains et spécialement dans les tissus répondant aux hormones stéroïdes (Peattie *et al.*, 1992 ; Ruff *et al.*, 1992).

## 2- Les formes mineures

### *a. La FKBP12A*

Une isoforme de la FKBP12 cytoplasmique, la FKBP12A a été identifiée dans le cerveau humain et bovin (Arakawa *et al.*, 1994 ; Sewell *et al.*, 1994). Bien que la FKBP12A contienne le même nombre d'acides aminés que la FKBP12, ces deux protéines migrent différemment en électrophorèse et la masse moléculaire calculée de la FKBP12A est légèrement inférieure. La séquence d'acides aminés de la FKBP12A humaine présente 83% d'homologie avec la FKBP12. La protéine est abondante dans le cerveau, mais son ARNm est détectable dans tous les autres tissus examinés.

### *b. La FKBP12,6*

Récemment une nouvelle protéine, la FKBP12,6 a été purifiée, séquencée et caractérisée biochimiquement (Sewell *et al.*, 1994) puis clonée (Lam *et al.*, 1995). Son ARNm est présent dans tous les tissus testés, avec un taux d'expression élevé dans le cerveau et le thymus et un faible taux dans la rate et dans les lymphocytes circulants. La FKBP12 et la FKBP12,6 présentent des affinités égales pour le FK506 et inhibent la calcineurine de manière équivalente. Malgré leur forte homologie de séquence et leur répartition tissulaire identique, elles présentent une spécificité différente vis à vis des isoformes du récepteur à ryanodine (RyR). En effet, la FKBP12,6 se fixe spécifiquement à l'isoforme RyR-2 du muscle cardiaque, alors que la FKBP12 se fixe à l'isoforme RyR-1 du muscle squelettique (Lam *et al.*, 1995).

### *c. Les FKBP 51 et 54*

Ces deux FKBP, distinctes de la FKBP52, ont été décrites comme faisant partie des hétérocomplexes récepteurs à hormones stéroïdiennes. La FKBP54 a été décrite dans le Poulet et chez l'Homme (Smith *et al.*, 1993) et la FKBP51 comme une nouvelle FKBP spécifique des cellules T (Baughman *et al.*, 1995). La FKBP51 présente 65% d'homologie avec la FKBP52, elles se distinguent de part leur localisation. Il existerait une redondance d'activité entre les FKBP51 et 52, mais avec une spécificité tissulaire (Nair *et al.*, 1997).

#### d. La FKBP65

Un gène codant pour une protéine de 65 kDa a été identifié chez la souris. La protéine partage 46% d'homologie avec la FKBP12, 43% avec la FKBP13, 25% avec la FKBP25 et 26% avec la FKBP52. La FKBP65 contient 4 domaines FKBP. L'ADNc code pour une protéine possédant une région très hydrophobe en position N-terminale, suggérant l'existence d'un peptide signal. Ainsi, la masse prédite de la protéine mature est de 60 kDa. Cependant par immunorévélation à l'aide d'anticorps polyclonaux, deux protéines de 68 et 72 kDa ont été révélées. Ces différences de masse s'expliquent par la glycosylation des deux formes et la phosphorylation supplémentaire de la forme de 72 kDa.

L'analyse en Northern blot révèle la présence d'ARNm de la FKBP65 dans les poumons, la rate, le coeur, le cerveau et les testicules (Coss *et al.*, 1996).

Les caractéristiques structurales des 4 isoformes majeures des FKBP chez les Vertébrés sont résumées dans le Tableau II p36 et dans la Figure 2 p37.

## II- LES PROPRIETES COMMUNES DES IMMUNOPHILINES

### A- Activité Peptidyl Prolyl *Cis-Trans* Isomerase

Durant la synthèse protéique, les liaisons peptidiques impliquant un résidu proline sont en conformation *trans*, alors que dans la structure tridimensionnelle, 15% de ces liaisons sont retrouvés sous la conformation *cis*. Les enzymes possédant une activité peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) pourraient catalyser cette interconversion (Figure 3). En effet, il a été montré *in vitro* que les PPIases accélèrent l'isomérisation *cis-trans* de peptides de synthèse (Fisher *et al.*, 1989). *In vivo*, seule la CyP Nina A est directement impliquée dans la mise en conformation de protéines (Shieh *et al.*, 1989).

L'isomérisation *cis-trans* de la liaison peptidyl prolyl a été identifiée comme étant une étape lente dans le repliement des protéines, suggérant que les PPIases doivent jouer un rôle important dans la catalyse de ce processus.

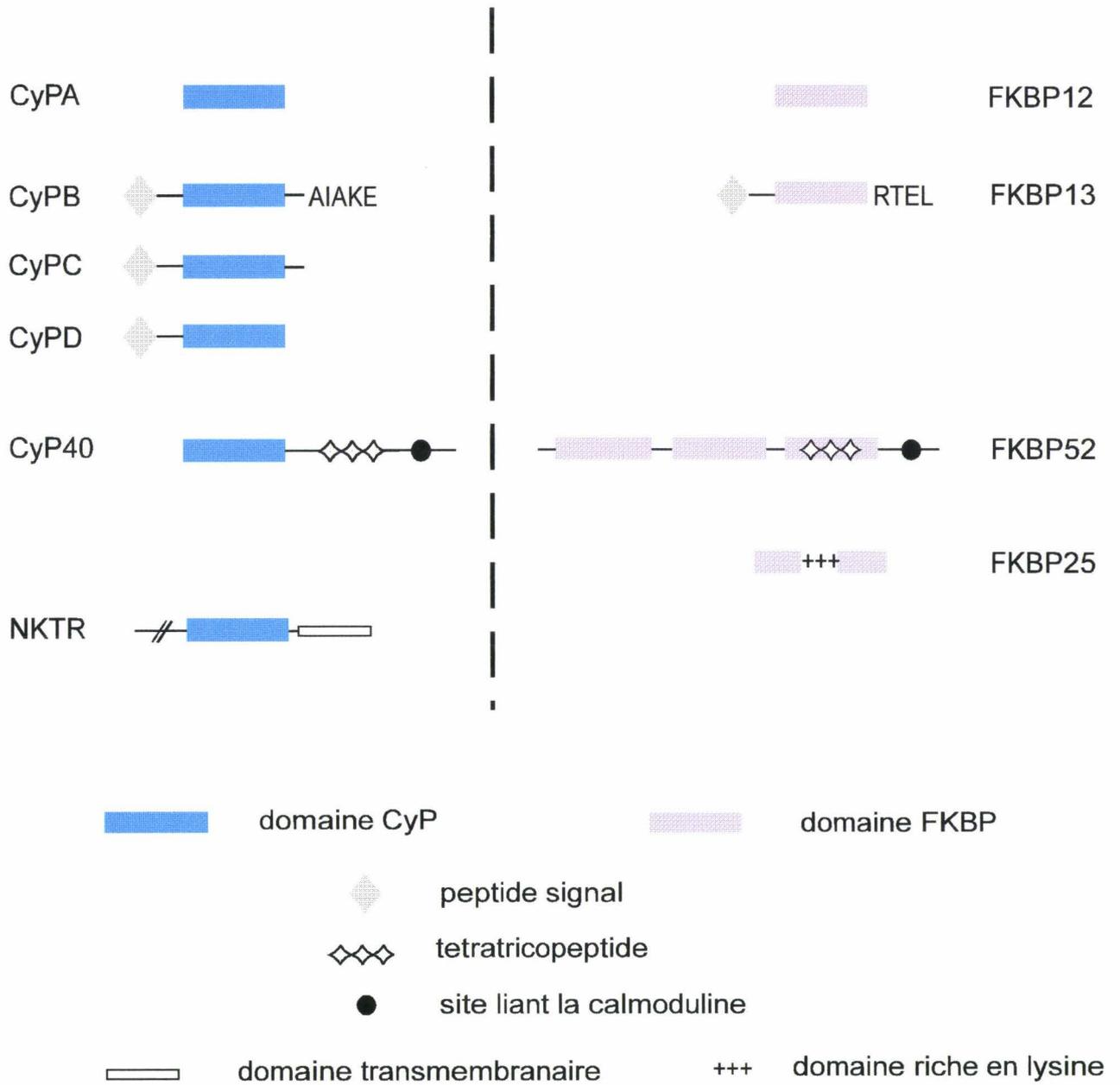
Cependant, l'inhibition de cette activité enzymatique, par des analogues de CsA et de FK506 non-immunosuppresseurs, semble avoir peu d'effet sur la survie et la croissance de cellules de mammifère (Bierer *et al.*, 1990a ; Sigal *et al.*, 1991 ; Dumont *et al.*, 1992).

Tableau I : Les cyclophilines chez les Vertébrés

	MM <sub>kDa</sub>	N <sub>aa</sub>	Localisation cellulaire	Références
CyPA	18	165	cytoplasme liquides biologiques	Handschumacher <i>et al.</i> , 1984 Billich <i>et al.</i> , 1997
CyPB	21	184	réticulum endoplasmique liquides biologiques	Price <i>et al.</i> , 1991 Spik <i>et al.</i> , 1991 Allain <i>et al.</i> , 1995
CyPC	23	212	réticulum endoplasmique	Friedman & Weissman, 1991
CyPD	18	164	mitochondrie	Bergsma <i>et al.</i> , 1991
CyP40	40	370	cytoplasme	Kieffer <i>et al.</i> , 1992
NK-TR	158	1403	membranaire	Anderson <i>et al.</i> , 1993

Tableau II : Les FKBP's chez les Vertébrés

	MM <sub>kDa</sub>	N <sub>aa</sub>	Localisation cellulaire	Références
FKBP12	12	108	cytoplasme	Siekierka <i>et al.</i> , 1989a
FKBP13	13	120	réticulum endoplasmique	Jin <i>et al.</i> , 1991
FKBP25	25	215	noyau	Wiederrecht <i>et al.</i> , 1992
FKBP52	52	459	noyau, cytoplasme	Peattie <i>et al.</i> , 1992 Lebeau <i>et al.</i> , 1992

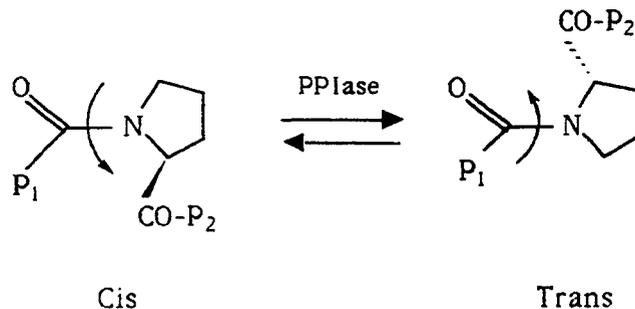


**Figure 2 : Comparaison structurale des différentes immunophilines chez les Vertébrés.**

De même, les CyPs et les FKBP ne sont pas indispensables à la viabilité des organismes inférieures. En effet, la délétion ou des mutations défectueuses des gènes codant pour CYP1 et CYP2 (homologues de la CyPA et la CyPB) et pour FKBP1 (homologue de la FKBP12) chez la levure n'affectent pas la viabilité des cellules (Koser *et al.*, 1991 ; Tropschug *et al.*, 1989 ; Koltin *et al.*, 1991 ; Heitman *et al.*, 1991).

Cependant, en cas de stress, le taux de la CYP1 est multiplié par deux à trois, ce qui peut s'expliquer par la présence dans le promoteur du gène de cette CyP 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 température, ce qui suppose que ces protéines ont un rôle de hsp chez la levure (Sykes *et al.*, 1993). Il semblerait qu'il n'en soit pas de même pour les FKBP. Dans des conditions de stress, l'expression de la FKBP1 n'est pas affectée et les levures déficientes en trois isoformes de FKBP (les homologues de la FKBP12, FKBP13 des mammifères et la FKBP46 de la levure) survivent et se développent à des températures élevées, aussi bien que dans des conditions normales (Benton *et al.*, 1994).

Ces protéines universelles, abondantes, très conservées mais ne servant apparemment à aucune fonction essentielle, présentent un paradoxe intrigant.



**Figure 3 : Isomérisation *cis-trans* de la liaison prolyl**

L'activité PPIase est couramment mesurée par la méthode de spectrophotométrie, développée par Fischer *et al.* (1984). Cette méthode est basée sur la capacité de l' $\alpha$ -chymotrypsine à libérer le *p*-nitroaniline de peptides tels que le succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroaniline (succ.AAPF.pNA) uniquement si la liaison du côté N-terminal du résidu de proline est en conformation *trans*. L'addition d' $\alpha$ -chymotrypsine cause une très rapide

libération de *p*-nitroaniline proportionnelle à la quantité de conformation *trans*, suivie par une lente libération due à l'isomérisation spontanée en l'isomère *trans*. Les PPIases augmentent la vitesse de cette isomérisation et accélèrent ainsi la seconde étape lente de la réaction.

Le succ.AAPF.pNA est le peptide synthétique le plus couramment utilisé pour la mesure de l'activité PPIase des CyPs, alors que les PPIases de la famille des FKBP et des parvulines ont une préférence pour des substrats ayant un résidu hydrophobe leucine ou phénylalanine précédant la proline, tels que le succ.ALPF.pNA ou le succ.AFPF.pNA.

D'autres approches ont été développées pour mesurer l'activité PPIase, tels que le recouvrement de l'activité de la RNase T1 (Fischer & Bang, 1985), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et des méthodes de fluorimétrie.

## B- Récepteurs des immunosuppresseurs

En dehors de leur activité PPIase commune, les immunophilines possèdent la propriété de fixer des immunosuppresseurs, propres à chaque famille.

### 1- La CsA

La CsA 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*. Il a été dénombré au moins 25 composés naturels de cette molécule (Von Wartburg & Traber, 1986) mais seule la CsA est couramment utilisée pour ses propriétés pharmaceutiques.

La CsA 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 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 L-méthyl-valine (MeVal-11) (Figure 4). Parmi les analogues de la CsA, la CsG, ou Nva-2-CsA (CsA substituée en 2 par la norvaline), et la CsH, ou D-MeVal-11-CsA (CsA substituée en 11 par l'épimère D de la MeVal) sont couramment utilisées en recherche. En effet, la CsG se fixe aux CyPs mais possède une activité immunosuppressive plus faible que la CsA alors que la CsH a perdu ces activités.

La CsA 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 la polyarthrite rhumatoïde (PR), le psoriasis, le diabète insulino-dépendant et les uvéites mais à des doses inférieures à celles prescrites lors de transplantation d'organes.

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- Le FK506 (Tacrolimus)

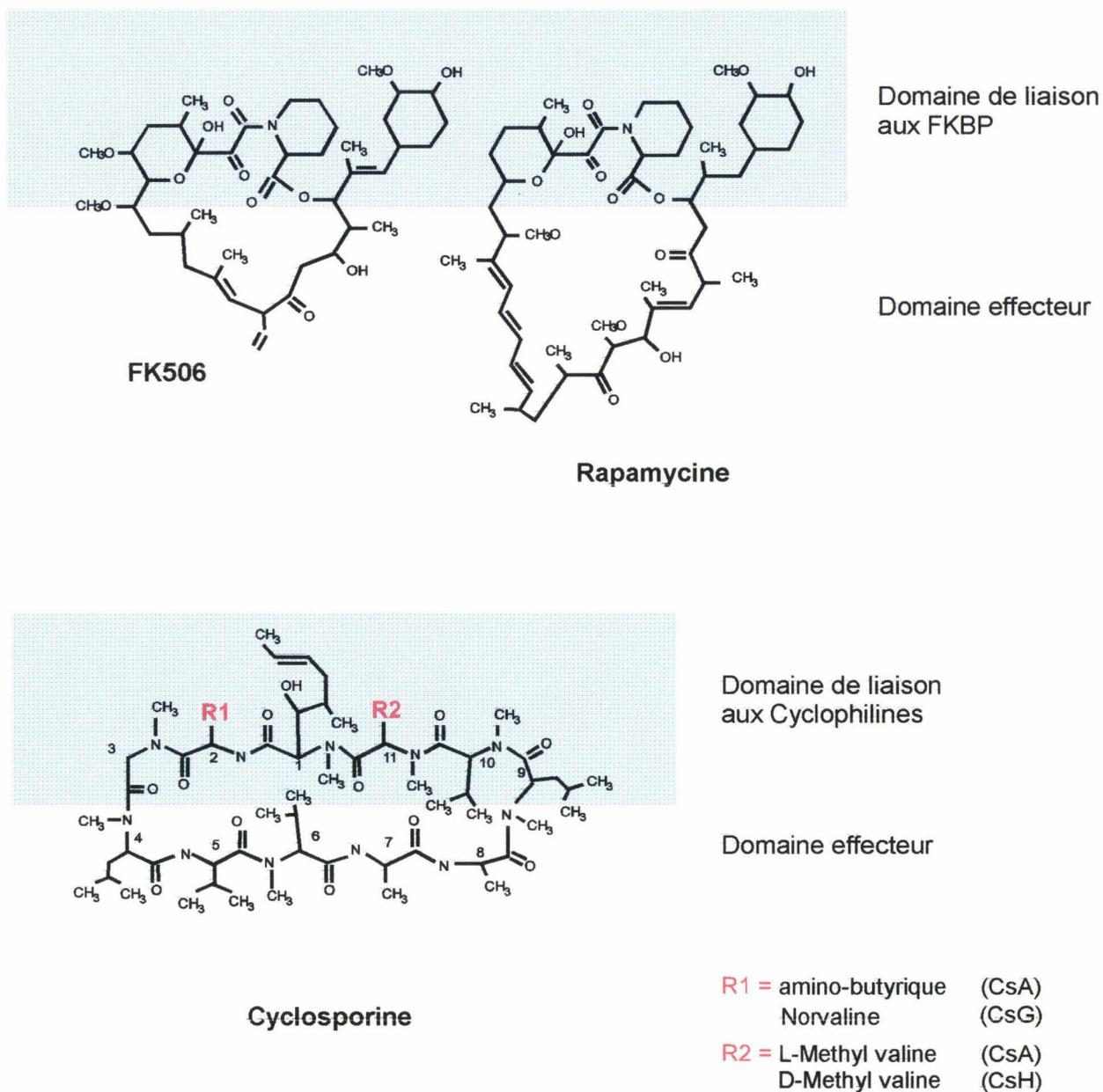
Le champ d'investigation ouvert par la CsA a conduit à la découverte du FK506. Cette molécule est produite par *Streptomyces tsukubaiensis*. Contrairement à la CsA, le FK506 est un macrolide de structure lactone (Figure 4) (Stütz, 1992). Le FK506 présente une activité immunosuppressive similaire à la CsA et commence à être utilisé en France. Toutefois, la CsA reste à ce jour le traitement de choix dans la prévention de rejet de greffe. Le FK506 pourrait remplacer la CsA dans les cas de toxicité liée à une intolérance à cette dernière.

## 3- La rapamycine (Sirolimus)

La rapamycine est un macrolide de structure apparentée au FK506 (Figure 4), produit par *Streptomyces hygroscopicus*. Connue d'abord pour ses propriétés antifongiques, son activité immunosuppressive a été décrite en 1977 (Stütz, 1992). Bien que sa structure soit proche du FK506, elle présente un mécanisme immunosuppresseur différent en bloquant non pas l'activation du lymphocyte T mais la prolifération induite par l'IL2.

## C- Interaction immunosuppresseur/immunophiline

L'activité PPIase des immunophilines est abolie par la fixation des immunosuppresseurs respectifs (Harding *et al.*, 1989 ; Siekierka *et al.*, 1989a ; Galat *et al.*, 1992 ; Peattie *et al.*, 1992) qui miment l'état de transition *cis-trans* de la liaison Xaa-Pro. Chaque immunosuppresseur possède dans sa structure deux domaines fonctionnels. On distingue un domaine de liaison à l'immunophiline, identique pour le FK506 et la rapamycine et un domaine effecteur, spécifique à chaque médicament, permettant l'interaction avec un partenaire protéique et qui rend compte de leur activité biologique différente (Figure 4).



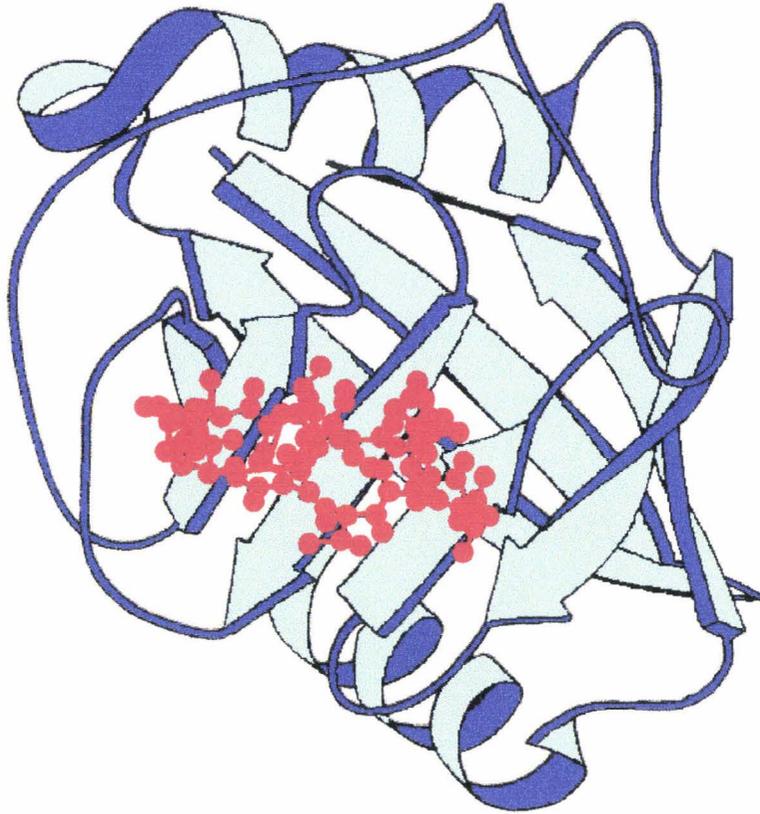
**Figure 4 : Structures des immunosuppresseurs avec leur domaine de liaison aux immunophilines et leur domaine effecteur (Quesniaux, 1993).**

### 1- Les complexes CsA/CyP

Les CyPs sont capables de fixer spécifiquement et réversiblement une molécule de CsA. Les constantes de dissociation  $K_d$  de la CsA pour les différentes CyPs sont comprises entre  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  M (Liu *et al.*, 1990 ; Husi & Zurini, 1994) (Tableau III).

En solution, la CsA présente de nombreux conformères mais seule la forme tout *trans* se fixerait aux CyPs. En effet, une fois complexée aux CyPs, toutes les liaisons peptidiques de la CsA sont en *trans*. Il faut environ une heure pour que le maximum de complexes soit formés, ce qui correspond au temps nécessaire pour la transition totale de la CsA sous le conformère final tout *trans* (Zeder-Lutz *et al.*, 1993). Le site de fixation de la CsA est localisé dans la poche hydrophobe formée de feuillettes  $\beta$  et située à la surface des CyPs (Figure 5) (Hsu *et al.*, 1990). Les interactions entre la CsA et les CyPs font intervenir les résidus MeBmt-1, Abu-2, Sar-3, MeLeu-9, MeLeu-10 et MeVal-11. Le résidu MeVal-11 est déterminant pour cette interaction. Il se positionne dans la même poche hydrophobe que la proline des substrats de la CyPA (Thériault *et al.*, 1993). Ceci explique pourquoi la CsG se fixe encore aux CyPs alors que la CsH a perdu cette capacité. En effet, la substitution de la valine par la norvaline dans la CsG ne modifie pas la conformation de la molécule. Par contre, la substitution de la L-MeVal-11 par l'épimère D dans la CsH provoque une torsion dans la molécule cyclique, annulant ainsi sa capacité à se fixer aux CyPs (Von Wartburg & Traber, 1986). La conformation de la CsA associée aux CyPA ou CyPB est similaire (Mikol *et al.*, 1994) mais est légèrement différente quand elle est associée à la CyPC, sans doute en raison de modifications conformationnelles à proximité du site de fixation (Ke *et al.*, 1993). Les acides aminés des CyPs impliqués dans la fixation de la CsA ont été essentiellement étudiés par mutagenèse dirigée, et il en ressort que le tryptophane (Trp121 dans la CyPA), conservé dans toutes les CyPs d'origine eucaryote, est indispensable à la fixation de la CsA (Zydowsky *et al.*, 1992).

Une fois complexée à la CyP, la CsA inhibe l'activité PPIase (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. Les constantes d'inhibition de l'activité PPIase par la CsA ont été déterminées par mesure de la concentration de compétiteur permettant une inhibition de 50% de l'activité enzymatique ( $DI_{50}$ ) (Tableau III). Les valeurs varient beaucoup dans la littérature, selon la méthode de mesure et le substrat utilisé. Nous pouvons remarquer que les  $K_d$  et les  $DI_{50}$  de la CsA sont très proches.



**Figure 5 : Représentation tridimensionnelle du complexe CyPA/CsA (Schreiber & Crabtree, 1992).**

## 2- Les complexes FK506/FKBP ou rapamycine/FKBP

Les FKBP sont capables de fixer de manière spécifique et réversible le FK506 et la rapamycine (Siekierka *et al.*, 1989b). Le FK506 et la rapamycine ont un site commun de fixation aux FKBP. La fixation se fait dans une poche hydrophobe de la protéine. En solution, le FK506 existe majoritairement sous une forme *cis* mais seule la forme *trans* se lie aux FKBP.

La rapamycine en solution est déjà sous la forme *trans*, ce qui pourrait expliquer le fait que les constantes de dissociation de la rapamycine sont plus faibles que celles du FK506 (Tableau IV).

Comme la CsA, le FK506 et la rapamycine miment l'état de transition *cis-trans* de la liaison prolyl et inhibent l'activité PPIase des FKBP. Par contre, la CsA n'inhibe pas cette activité enzymatique, suggérant une spécificité plus étroite. Les constantes d'inhibition ont été également déterminées et sont décrites dans le Tableau IV.

## 3- Les autres PPIases

Outre les CyPs et les FKBP qui sont regroupées dans la famille des immunophilines, d'autres protéines n'appartenant pas à cette famille possèdent cependant une activité PPIase. On distingue la parvuline et le Trigger factor.

### *a. La parvuline*

En 1994, une nouvelle PPIase de 10,1 kDa, la parvuline, a été identifiée dans le cytoplasme d'*Escherichia coli*. Elle n'appartient ni à la famille des CyPs ni à celle des FKBP (Rahfeld *et al.*, 1994a ; Rahfeld *et al.*, 1994b). Elle ne présente aucune similitude entre les séquences peptidiques et ne possède aucune affinité pour la CsA, le FK506 et la rapamycine. Son activité enzymatique est comparable à celle des CyPs et supérieure à celle des FKBP (Fischer, 1996).

### *b. Le Trigger factor*

Le Trigger factor a été identifié chez *E. coli* comme étant une PPIase de 48 kDa (Stoller *et al.*, 1995). Il est situé adjacent aux chaînes polypeptidiques naissantes de la sous-unité 50 S du ribosome (Valent *et al.*, 1995 ; Hesterkamp *et al.*, 1996).

**Tableau III : Constantes de dissociation et d'inhibition de l'activité PPIase  
des CyPs par la CsA**

	Kd (nM)		DI <sub>50</sub> (nM)	Références
CyPA	36,8		1,6-25	Price <i>et al.</i> , 1991 Bergsma <i>et al.</i> , 1991 Husi & Zurini, 1994
CyPB	9,8		9-84	Price <i>et al.</i> , 1991 Bram <i>et al.</i> , 1993 Husi & Zurini, 1994
CyPC	90,8		6	Bram <i>et al.</i> , 1993 Husi & Zurini, 1994
CyPD	10		8	Bergsma <i>et al.</i> , 1991
CyP40	300		300	Kieffer <i>et al.</i> , 1993
NK-TR			770	Rinfret <i>et al.</i> , 1994

Toutes les CyPs possèdent une activité PPIase.

**Tableau IV : Constantes de dissociation et d'inhibition de l'activité PPIase des FKBP  
par le FK506 et la rapamycine.**

	Kd et DI <sub>50</sub> (nM)		Références
	FK506	rapamycine	
FKBP12	0,4	0,2	Siekierka <i>et al.</i> , 1989
FKBP13	55		Jin <i>et al.</i> , 1991
FKBP25	160	0,9	Galat <i>et al.</i> , 1992 Jin <i>et al.</i> , 1992
FKBP52	10	8	Peattie <i>et al.</i> , 1992

Toutes les FKBP possèdent une activité PPIase.

De part sa localisation, le Trigger factor serait la première enzyme impliquée dans l'isomérisation de liaisons proyles des protéines néosynthétisées.

La comparaison de séquence du Trigger factor et de la CyP18 d'*E. coli* ne révèle aucune similitude. Par contre, l'analyse des groupements hydrophobes indique un faible pourcentage de similitude (28%) entre la FKBP12 et le noyau catalytique du Trigger factor (Stoller *et al.*, 1996 ; Hesterkamp & Bukau, 1996). Cependant, l'incapacité à inactiver entièrement l'activité du Trigger factor d'*E. coli* ou de son domaine catalytique par de fortes concentrations en FK506 (Stoller *et al.*, 1995 ; Stoller *et al.*, 1996) positionne cette enzyme dans un sous-groupe particulier de la famille des FKBP (Fischer, 1996).

## IMMUNOSUPPRESSION

### I- L'IMMUNITE DE GREFFE

Le destin d'une greffe dépend dans une large mesure des différences de compatibilité existant entre le donneur et le receveur. Chaque individu est caractérisé par son système HLA (*Human Leucocyte Antigen*) constitué des antigènes majeurs d'histocompatibilité. Ces antigènes sont de véritables marqueurs d'identité. Lorsque donneur et receveur ne sont pas génétiquement identiques, les "marqueurs du soi" de ces individus sont différents. Le système immunitaire du receveur reconnaît alors le caractère étranger du greffon et déclenche un rejet inévitable. La survie de la greffe dépendra donc dans une large mesure d'une bonne compatibilité au niveau du système HLA, et nécessitera presque toujours un traitement immunosuppresseur.

#### **A- Les antigènes reconnus sur la greffe et les cellules sensibilisantes**

Les allogreffes d'organe se présentent comme une mosaïque de cellules qui expriment toutes sur leur membrane, en quantité variables, des antigènes d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et pour une minorité d'entre elles les antigènes de classe II (CMH-II) (Bevan *et al.*, 1977). En effet, les CMH-I sont présents à la surface de la quasi-totalité des cellules de l'organisme alors que les CMH-II ont une distribution plus étroite. Ces derniers sont seulement présents à la surface des lymphocytes B et certaines cellules phagocytaires telles que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces molécules ont pour principale fonction de présenter l'antigène aux lymphocytes et permettre le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace. La reconnaissance spécifique est réalisée par l'interaction du complexe TCR/CD3 du lymphocyte T avec l'antigène présenté par les molécules du CMH-I ou -II. Des molécules accessoires vont également intervenir pour renforcer la liaison entre la cellule présentatrice et le lymphocyte T.

D'autres alloantigènes indépendants des antigènes majeurs d'histocompatibilité peuvent aussi intervenir en cas d'identité du CMH. Il s'agit d'alloantigènes mineurs d'histocompatibilité et de certains alloantigènes spécifiques d'organes, antigènes toutefois insuffisants pour déclencher la réponse d'allorecognition. En raison de leur expression à la

surface des cellules de l'endothélium vasculaire, les antigènes de groupes sanguins ABO semblent également intervenir, mais dans une moindre mesure. C'est parce que la compatibilité A/B/O est impérativement respectée que le rejet suraigu peut être évité.

## **B- Mécanismes de rejet de greffe**

### 1- La phase de sensibilisation

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 de l'alloantigène et l'infiltration du greffon. La sensibilisation des lymphocytes T permettant la reconnaissance de l'antigène, la prolifération et la différenciation des lymphocytes peut s'effectuer soit par migration des cellules dendritiques du greffon vers les tissus lymphoïdes du receveur, soit directement au niveau du greffon dans le cas d'une transplantation, c'est à dire lorsque le greffon est vascularisé facilitant la circulation des cellules T de l'hôte.

#### *a. Activation des lymphocytes T*

##### $\alpha$ - Les différentes étapes d'activation

L'activation des lymphocytes T comporte au moins trois étapes :

- 1<sup>ère</sup> étape : acquisition de compétence. Elle correspond à l'entrée de la cellule quiescente dans le cycle cellulaire et se traduit en particulier par l'expression du récepteur de forte affinité pour l'IL2 qui résulte en l'association de la sous unité  $\alpha$  (CD25) du récepteur de l'IL2 aux 2 chaînes préexistantes  $\beta$  et  $\gamma$  (Takeshita *et al.*, 1992).

- 2<sup>ème</sup> étape : prolifération lymphocytaire contrôlée par les facteurs de croissance des cellules T dont le principal est l'IL2.

- 3<sup>ème</sup> étape : différenciation fonctionnelle caractérisée par une production diversifiée de lymphokines (IFN $\gamma$ , IL4, ...). Certains lymphocytes deviennent alors des lymphocytes "mémoires".

Ces événements se traduisent par la transcription d'au moins cent gènes et se divisent en 3 phases (Ullman *et al.*, 1990 ; Fraser *et al.*, 1993) :

- phase immédiate qui a lieu dans les 30 premières minutes. Elle se traduit par la mobilisation de facteurs de transcriptions comme c-jun, c-fos, c-myc, NF-AT et NF- $\kappa$ B.

- phase précoce qui nécessite une synthèse protéique et survient avant la première division cellulaire. Elle se caractérise par la synthèse de nombreuses cytokines en particulier l'IL2 pour les cellules naïves et un plus large panel de cytokines (IL3, -4, -5, -6, -10, IFN $\gamma$ , GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)...) pour les cellules mémoires. Les lymphocytes synthétisent également des molécules membranaires tels que le CD25 et le CD69.

- phase tardive qui apparaît après la 1<sup>ère</sup> division cellulaire et qui se caractérise 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.

L'étape critique d'acquisition de compétence nécessite l'intégration par la cellule de plusieurs signaux : l'engagement du complexe TCR/CD3, en association avec les marqueurs CD4 pour les lymphocytes T auxiliaires, et CD8 pour les lymphocytes T effecteurs, pour son interaction spécifique avec l'antigène et plusieurs signaux co-stimulateurs par l'intermédiaire de CD28, CD2 et CD5.

### $\beta$ - La transmission des signaux d'activation par le TCR

Le TCR est un hétérodimère formé de 2 chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Le CD3, associé de façon non covalente au TCR, est responsable de la transmission des signaux externes vers l'intérieur de la cellule. Il est composé des protéines  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\xi$ . Le complexe TCR/CD3 serait, d'un point de vue stoechiométrique, un complexe formé de quatre dimères, TCR  $\alpha\beta$ ,  $\xi_2$ ,  $\delta\epsilon$ ,  $\gamma\epsilon$ .

#### → Evènements précoces de l'activation

La reconnaissance du peptide antigénique fixé au CMH par le TCR/CD3 est suivie au niveau intracellulaire par un ensemble d'évènements biochimiques précoces qui aboutissent dans un premier temps à l'activation d'une enzyme ubiquitaire, la PLC $\gamma$ 1, une phospholipase régulée par phosphorylation sur des résidus tyrosine. Lors de la stimulation du TCR, d'autres protéines membranaires, telles que le CD5 et le CD3  $\delta$  et  $\gamma$ , et cytoplasmiques, telle que la protéine p21<sup>ras</sup>, sont phosphorylées sur des résidus tyrosine. Trois protéines tyrosine-kinases (PTK) ont été caractérisées. Il s'agit de la p56<sup>lck</sup> associée aux CD4 ou CD8, la p59<sup>fyn</sup> associée

à la partie cytoplasmique du TCR et la ZAP-70 (*Zeta Associated Protein*) associée à la chaîne  $\xi$  du CD3 (Baldari *et al.*, 1993 ; Weiss & Littman, 1994).

→ Evènements tardifs :

- L'activation de la PLC $\gamma$ 1 conduit à la production de deux seconds messagers, le phosphatidyl inositol 2, 4, 5-triphosphate (IP $_3$ ) et le diacylglycerol (DAG). Le DAG provoque l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'IP $_3$  induit une augmentation de la concentration du Ca $^{2+}$  intracytoplasmique libre qui est responsable de l'activation de la calcineurine et de la PKC en synergie avec le DAG.

- La calcineurine, sérine phosphate de type PP2B, dépendante du Ca $^{2+}$  et de la calmoduline, va déphosphoryler la sous-unité cytosolique du facteur de transcription spécifique du lymphocyte T, le NF-AT, et permettre sa translocation dans le noyau. C'est à cette étape d'activation que la CsA et le FK506 exercent leur propriété immunosuppressive, en inhibant l'activité phosphatasique de la calcineurine (Emmel *et al.*, 1989).

- Parallèlement, la p21<sup>ras</sup> activée régule la cascade des MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein kinases*) aboutissant à l'activation des facteurs de transcription dont c-jun et c-fos et à l'induction de la sous-unité nucléaire de NF-AT (Cantrell, 1994).

D'autres facteurs de transcription interviennent lors de l'activation cellulaire : Oct-1 est exprimé de façon constitutive dans toutes les cellules T. Le NF- $\kappa$ B, comme le NF-AT, n'est actif que dans les cellules T activées. L'activation de NF- $\kappa$ B requiert l'action combinée de la calcineurine et de la PKC. La PKC phosphoryle l'inhibiteur cytoplasmique I- $\kappa$ B qui va libérer NF- $\kappa$ B et permettre sa translocation dans le noyau sous une forme active. NF- $\kappa$ B participe à l'activation transcriptionnelle des gènes codant pour l'IL2 et pour la chaîne  $\alpha$  de son récepteur. Il agit en synergie avec d'autres facteurs transcriptionnels et ne peut être efficace en leur absence : AP-1, dimère composé de protéines de la famille fos et jun et le CD28RC (*CD28 Responsive Complex*) (Emmel *et al.*, 1989 ; Brabletz *et al.*, 1991 ; Randak *et al.*, 1991 ; Fraser *et al.*, 1991).

La transcription du gène de l'IL2 nécessite l'interaction coopérative entre ces différents facteurs nucléaires et donc la convergence de plusieurs voies de transduction. Ces différentes étapes sont résumées dans la Figure 6.

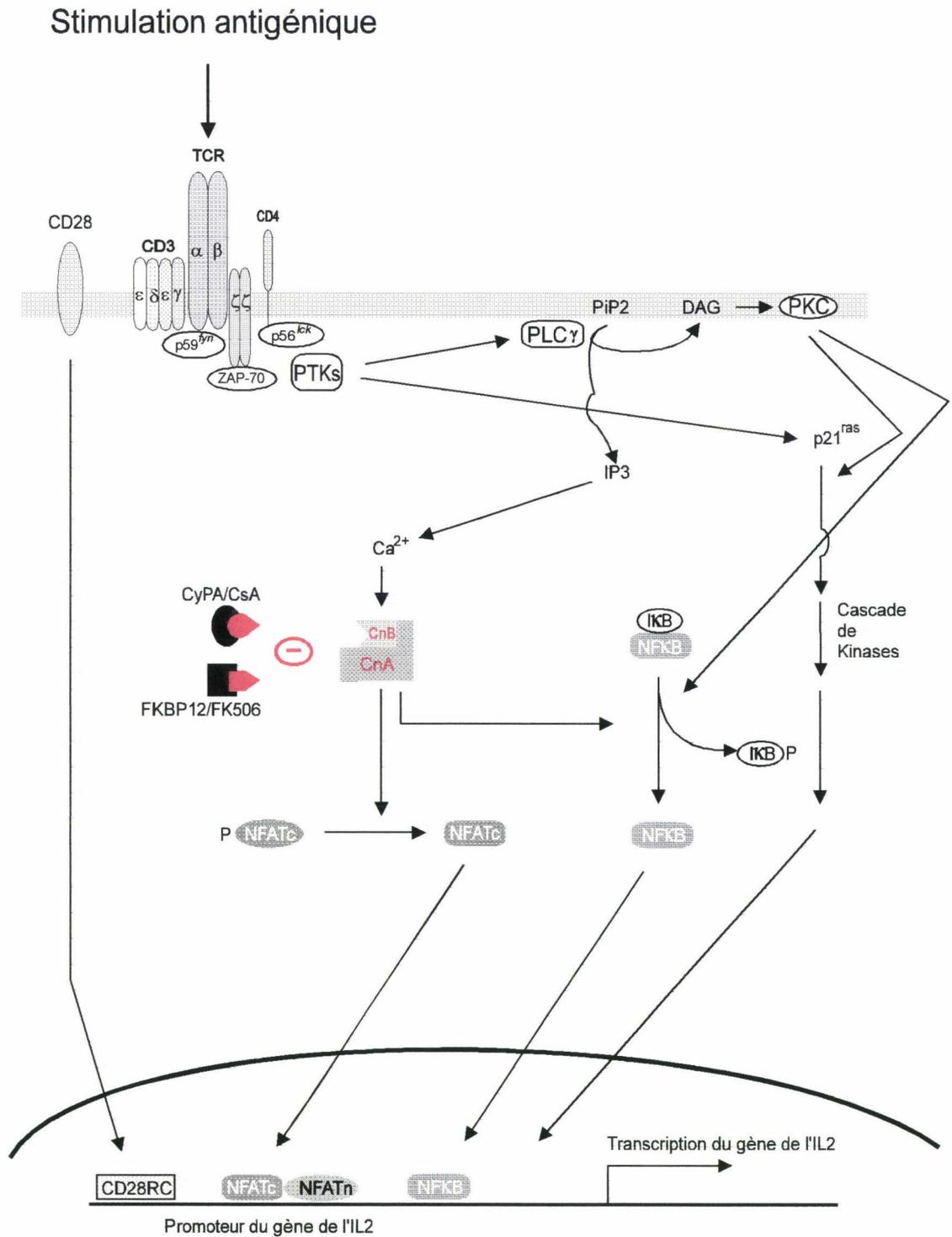


Figure 6 : Voies de transduction du signal menant à l'activation du lymphocyte T après stimulation du complexe TCR/CD3.

→ Principales molécules de régulation du signal :

Outre le TCR/CD3, d'autres composants membranaires vont intervenir dans l'activation des lymphocytes T, tels que le CD2, CD5, CD28 et le CD45 essentiellement.

Le CD28 est une glycoprotéine dimérique de 44 kDa. Elle est exprimée par une majorité de lymphocytes T (95% des CD4<sup>+</sup> et 50% des CD8<sup>+</sup>). Ses ligands sont le CD80 et le CD86 (ou B7/BB1). Un autre ligand de CD80-86 est le CTLA4, moins représenté mais plus affine que le CD28 (Linsley *et al.*, 1991). Le signal transmis après l'interaction du CD28 avec ses ligands est indispensable à l'activation efficace du lymphocyte T (Schwartz, 1992). Il implique l'activation d'une phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase) aboutissant à l'activation du CD28RC (June *et al.*, 1990). Cette voie est nécessaire à la production d'IL2 et se manifeste surtout par une stabilité accrue des ARNm des lymphokines, en particulier celui de l'IL2. La voie de signalisation via le CD28 est insensible à la CsA et au FK506 mais sensible à la rapamycine (Sigal & Dumont, 1992).

#### γ - Prolifération des lymphocytes T

Finalement, la production de l'IL2 va permettre aux lymphocytes d'entrer en phase de prolifération. Le récepteur de haute affinité pour l'IL2 est constitué de 3 chaînes α, β et γ. Seules les chaînes β et γ induisent un signal. La portion cytosolique de la chaîne β peut être divisée en deux domaines : un domaine acide et un domaine riche en résidus sérine qui participent à la transduction du signal (Sato *et al.*, 1992).

Le domaine acide est impliqué dans la fixation de PTKs, telles que JAK1 et JAK3 qui se fixent respectivement sur les chaînes β et γ du récepteur de l'IL2. L'activation de ces kinases conduit à la phosphorylation des protéines STAT, présentes dans le cytoplasme des cellules quiescentes. Ces dernières vont alors se dimériser et rejoindre le noyau où elles agissent en tant que facteurs de transcription spécifiques (Karnitz & Abraham, 1995).

Le domaine riche en sérine se lie à la p56<sup>lck</sup> qui aboutit à l'activation de la p21<sup>ras</sup> par l'intermédiaire de l'association des protéines Shc, Grb2 et Sos. Cependant, il n'est pas clairement établi si la p21<sup>ras</sup> couple le récepteur de l'IL2 à une cascade de kinases analogue à celle couplée au TCR (Pastor *et al.*, 1995).

En parallèle, la p56<sup>lck</sup> associée à la sous-unité β du récepteur de l'IL2 phosphoryle des phosphatidylinositol (PI) kinases (Taicham *et al.*, 1993). Cet événement est également décrit lors de l'interaction CD28/B7. L'activation de ces PI kinases mène à des événements impliqués dans la génération de facteurs de transcription nécessaires à l'expression de gènes et inhibés

par la rapamycine. Ces événements peuvent être l'activation de la p70 S6 kinase (Monfar *et al.*, 1995) dont le substrat majeur est la protéine S6 ribosomale nécessaire à une synthèse efficace de protéines, en particulier celles régulant le cycle cellulaire.

Ces trois voies (Figure 7) induites par la fixation de l'IL2 sur son récepteur agissent en synergie et sont nécessaires à la progression dans le cycle cellulaire et l'expansion clonale des cellules T.

### *b. Activation des cellules endothéliales*

Au repos, les cellules endothéliales des vaisseaux forment une barrière au passage des cellules sanguines et produisent une surface anticoagulante par le jeu de molécules telles que l'antithrombine III fixée aux héparanes sulfates (HS).

En réponse à des cytokines proinflammatoires, telles que l'IL1 ou le TNF $\alpha$ , à des LPS, ou à des facteurs du complément tels que le C5a et le CAM (complexe d'attache membranaire formé des composants terminaux du complément C5 à C9), les cellules endothéliales subissent un certain nombre de modifications morphologiques et transcriptionnelles décrites sous le terme d'activation (Poher, 1988). Celle-ci se manifeste par la production de chimiokines telles que l'IL8, de molécules d'adhésion (E et P sélectine, ICAM-1 et VCAM-2) et de facteurs d'agrégation plaquettaire et de coagulation.

L'endothélium activé établit alors une interface procoagulante (perte des héparanes sulfate (HS), production de thrombine), favorise l'activation plaquettaire, le recrutement et l'adhésion de leucocytes.

## 2- Migration et infiltration des lymphocytes

Trois types de médiateurs chimiques interviennent. Il y a d'abord :

- les sélectines favorisent l'adhésion des leucocytes circulants en se liant faiblement à eux. Ainsi, les cellules endothéliales établissent des liaisons avec leurs ligands glycosylés arborés à la surface des leucocytes. Ce phénomène baptisé "roulement" permet aux leucocytes d'adhérer faiblement à l'endothélium vasculaire.

- les intégrines ICAM-1 et VCAM-2, qui avec l'aide de chimiokines sécrétées et présentes à la surface de l'endothélium, renforcent cette adhésion (Springer, 1994).

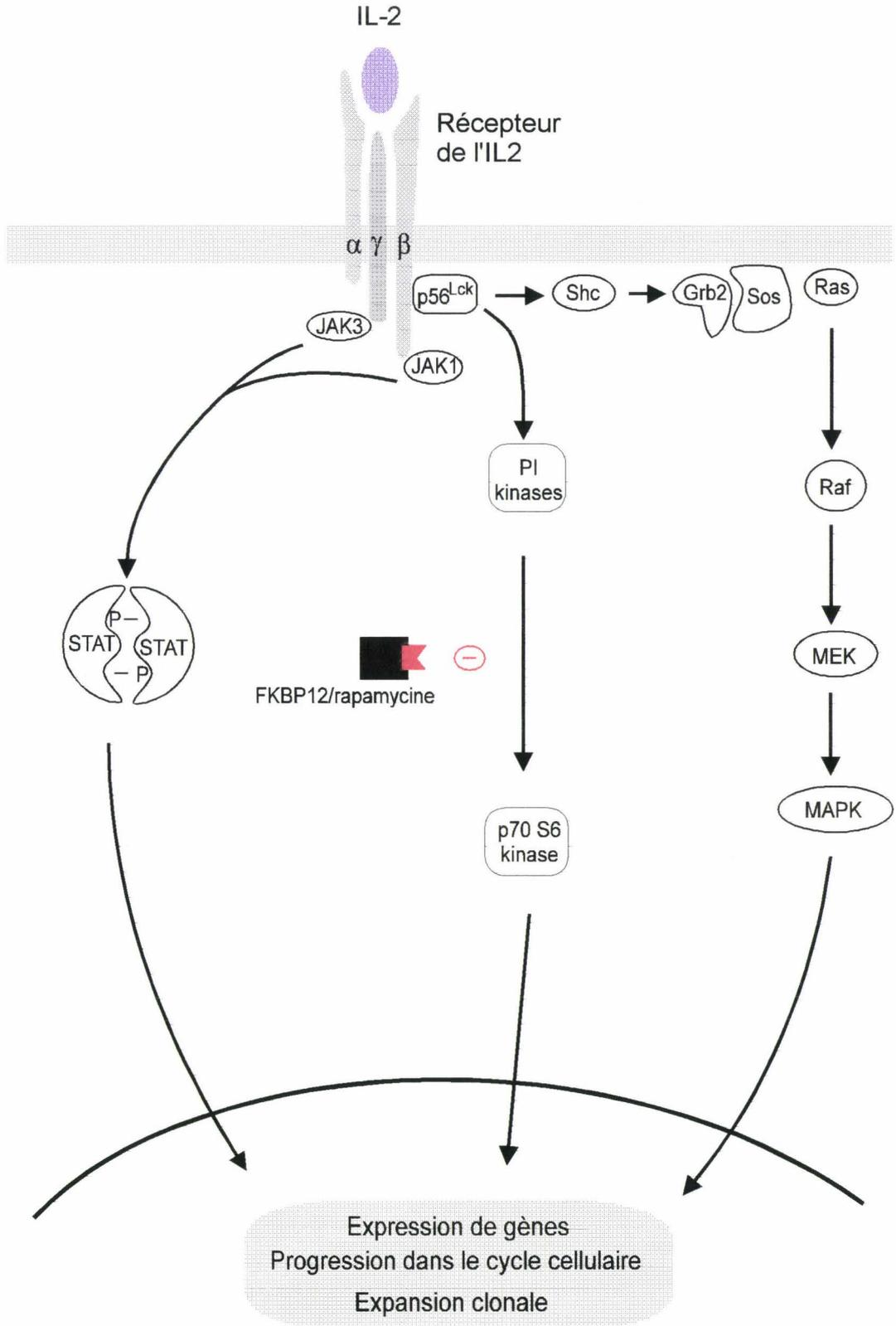


Figure 7 :Voies de transduction du signal menant à la prolifération du lymphocyte.

- les chimiokines sont secondées, dans leur action, par les glycosaminoglycannes (GAG) sulfatés abondant à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Ces derniers serviraient de point d'ancrage aux chimiokines le long de la paroi vasculaire, les préservant de l'entraînement par le flux sanguin.

Dès lors, les leucocytes s'immobilisent complètement et glissent entre les cellules endothéliales afin d'infiltrer le tissu en suivant le gradient de concentration formé par les chimiokines. Ainsi, l'accumulation des leucocytes sur le site d'inflammation est dépendante de la production et de la sécrétion locale de chimiokines.

De plus, la migration des lymphocytes T vers le site de l'inflammation est associée à la sécrétion de plusieurs enzymes dégradant la matrice extracellulaire, telle que l'héparinase ou endo- $\beta$ -D glucuronidase. L'héparinase est synthétisée et sécrétée par différentes cellules activées telles que les lymphocytes T, les plaquettes, les monocytes/macrophages et les neutrophiles (Gilat *et al.*, 1996). Elle coupe la partie HS de la matrice et peut ainsi faciliter l'infiltration des cellules dans les tissus. De plus, elle libère les cytokines et des facteurs de croissance qui étaient emprisonnés.

#### *a. Les sélectines*

Les sélectines sont une famille de glycoprotéines responsables de la reconnaissance initiale lors des phénomènes de domiciliation et de migration des leucocytes vers les sites d'inflammation (Haskard, 1994). Les trois membres de cette famille, E-, P- et L-sélectines, sont formés des domaines communs suivants : un domaine N-terminal lectinique dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ , un domaine *EGF-like*, une répétition de domaines homologues à des protéines liant le complément (en quantité variable selon le type de sélectine), un domaine transmembranaire et une courte séquence cytoplasmique. La L-sélectine est la plus petite des trois sélectines. Elle est présente sur la majorité des leucocytes et permet leur adhésion sur les cellules endothéliales. La E-sélectine, exprimée à la surface des cellules endothéliales activées, interagit avec les leucocytes. La sous-population de lymphocytes T qui se lie à la E-sélectine, exprime l'antigène CLA (*Cutaneous Lymphocyte Antigen*). Cet antigène possède une structure glycosylée proche mais pas identique au sialyl-Lewis X (s-Le<sup>X</sup>). La P-sélectine est exprimée sur les plaquettes et les cellules endothéliales activées et permet l'adhésion des monocytes, neutrophiles, cellules NK et une sous-population de lymphocytes T mémoires. En raison de la présence du domaine lectinique, les sélectines reconnaissent des ligands glycosylés tels que le motif s-Le<sup>X</sup> présent sur des glycoprotéines et des glycolipides. En effet, cet épitope

glycannique a été caractérisé sur des ligands spécifiques des sélectines, tels que le ligand PSGL-1 de la P-sélectine, le ligand ESL-1 de la E-sélectine et le ligand GlyCAM-1 de la L-sélectine où il apparaît sous une forme modifiée 6-sulfate s-Le<sup>x</sup>. De plus, Green *et al.* (1995) ont montré une liaison spécifique de la L-sélectine avec des oligosaccharides sulfatés, de type sulfo-Le<sup>x</sup> ou GAG sulfatés. Auparavant, il avait été montré que l'héparine inhibait fortement l'interaction entre le motif s-Le<sup>x</sup> et les L- et P-sélectines (Nelson *et al.*, 1993). Ainsi, certaines structures de type GAG sulfatés seraient également des ligands naturels pour les sélectines.

#### b. *Les chimiokines*

De masse moléculaire comprise entre 6 et 14 kDa, les chimiokines partagent des similitudes structurales et sont divisées en deux sous-classes selon la position de 4 résidus de cystéines formant des ponts disulfures. On distingue les chimiokines CXC (ou  $\alpha$  chimiokines) parmi lesquelles nous notons l'IL8 (ou NAP-1 pour "*neutrophil attracting peptide-1*"), NAP-2, GRO et les chimiokines CC (ou  $\beta$  chimiokines) avec RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), MIP-1 (*macrophage inflammatory protein*) et MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*). En général, les chimiokines CXC attirent essentiellement les neutrophiles et non les monocytes, alors que les CC attirent les monocytes et non les neutrophiles. Quelques chimiokines CC agissent aussi sur les basophiles et les éosinophiles et certains membres des 2 sous-classes attirent aussi les lymphocytes. Un troisième type de chimiokines a été mis en évidence. Cette chimiokine, désignée lymphotactine, ne possède que 2 des 4 cystéines invariantes des autres chimiokines. Actuellement, elle est le seul exemple de cette sous-famille de chimiokine C ou  $\gamma$ . La lymphotactine est chimiotactile pour les lymphocytes (Hedrick & Zlotnik, 1996).

Il a également été montré que certaines chimiokines CXC, telle que l'IL8 (Larson *et al.*, 1989), et CC, telle que RANTES (Schall *et al.*, 1990) présentent une activité chimiotactile vis à vis des lymphocytes T. MIP-1 $\alpha$  et  $\beta$  sont également de puissants chimioattractants des lymphocytes T activés (Taub *et al.*, 1993). L'analyse phénotypique révèle que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont capables de migrer en réponse à MIP-1 $\beta$  tandis que MIP-1 $\alpha$  induit un chimiotactisme prédominant des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. De plus, ces 2 cytokines augmentent la capacité des lymphocytes T à se lier aux cellules endothéliales. Ainsi, les chimiokines MIP-1 recrutent préférentiellement des sous-unités spécifiques de lymphocytes T durant l'évolution de la réponse immunitaire. Tanaka *et al.* (1993a) ont montré qu'immobilisé *in vitro* par fixation sur des protéoglycannes, tels que l'héparine conjuguée à la BSA ou le CD44

cellulaire, MIP-1 $\beta$  augmente l'adhésion des lymphocytes CD8<sup>+</sup> sur la matrice extracellulaire (Figure 8).

Les chimiokines se lient sélectivement aux GAG de type héparine/héparane sulfaté avec des affinités comprises entre 10<sup>-5</sup> et 10<sup>-8</sup> M selon les fractions d'héparine. Pour l'IL8, les affinités vis à vis de l'héparine et de l'HS sont identiques et sont de 5,5 10<sup>-6</sup> M. La force de liaison des chimiokines est principalement déterminée par le taux de sulfatation des chaînes GAG (Witt & Lander, 1994).

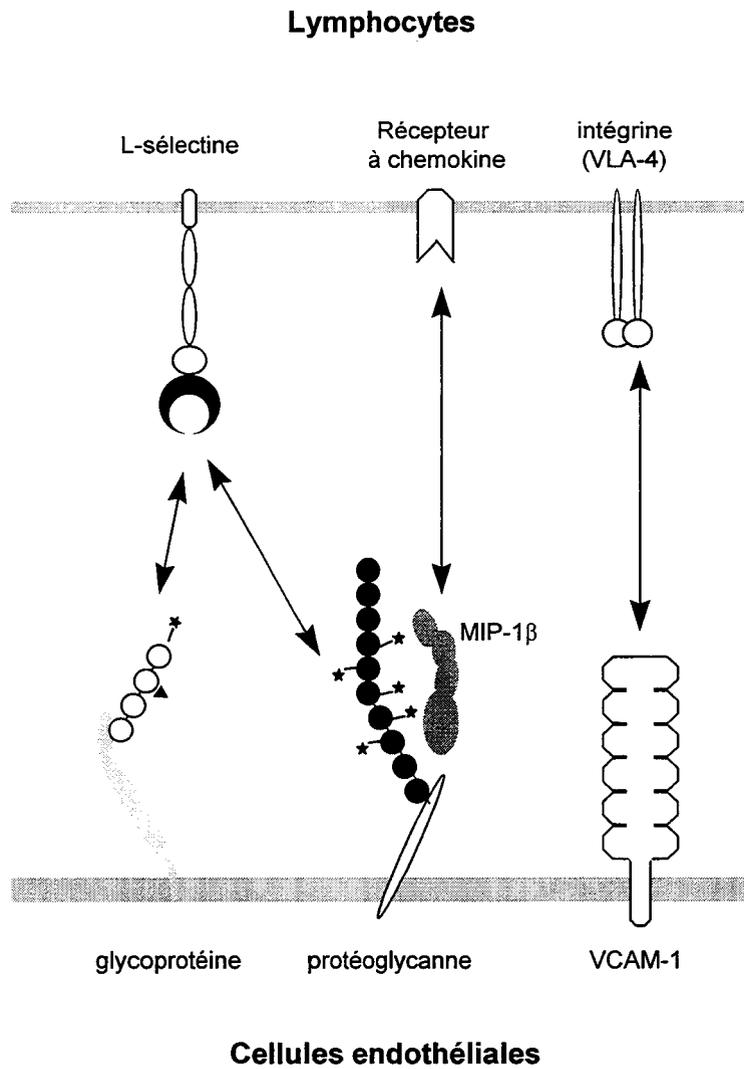
### *c. Les GAG des cellules endothéliales et des lymphocytes*

Les GAG sont des composants des protéoglycannes, constituants communs à la surface des cellules et de la matrice extracellulaire. Parmi les GAG, on distingue les HS, les chondroitines sulfates (CS), les dermatanes sulfates, les kératanes sulfates et l'acide hyaluronique. Les chaînes d'HS sont constituées d'acide glucuronique ou iduronique et de glucosamine, modifiées en plusieurs positions par des esters de sulfate liés en N et en O. Ces HS, malgré cette unité commune, présentent un polymorphisme de part la longueur des chaînes, le degré de sulfatation et l'organisation des différentes régions sulfatées.

La chaîne polysaccharidique des HS présente des régions riches en N- et O-sulfates séparées par des régions moins sulfatées. Cette organisation confère une conformation plus ou moins souple à la chaîne polysaccharidique et est responsable des propriétés de fixation spécifiques des protéines (Gallagher *et al.*, 1992 ; Stringer & Gallagher, 1997). Cette hétérogénéité structurale et la variation des régions sulfatées des HS sont dépendantes des cellules et des tissus.

### $\alpha$ - A la surface des cellules endothéliales

Près de 50 à 90% des protéoglycannes associés aux cellules endothéliales sont des protéoglycannes avec des HS (HSPG). Les cellules endothéliales synthétisent aux moins 5 types d'HSPG : les syndecan-1, syndecan-2 et syndecan-4 sont des protéoglycannes intégrés dans la membrane abondant à la surface luminale. Le glypican est ancré dans la membrane par un glycosylphosphatidyl-inositol (GPI). Le perlecan est un HSPG de la membrane basale des cellules endothéliales.



**Figure 8 : Représentation schématique des interactions moléculaires entre les membranes du lymphocyte et de la cellules endothéliales.** Le phénomène d'adhésion cellulaire entre lymphocytes et cellules endothéliales nécessite de nombreux mécanismes de reconnaissance moléculaire, notamment entre sélectines, intégrines et leurs contre-récepteurs, motifs sulfo- et sialyl- $\text{Le}^x$  et VCAM-1. Ces interactions sont renforcées par l'intervention des GAG sulfatés, qui peuvent se comporter comme ligand de la L-sélectine, et présenter les chimiokines à leurs récepteurs lymphocytaires. Symboles :  $\blacktriangle$ , fucose ;  $\circ$ ,  $\bullet$ , autres monosaccharides ;  $\star$ , sulfate. (selon Green *et al.*, 1995).

Le CD44 est également un protéoglycane avec des chaînes d'HS et de CS. Il fixe des cytokines possédant un site de liaison pour les GAG. Il est exprimé à la surface de l'endothélium et augmente avec l'activation. Le CD44 présente des différences structurales marquantes entre les tissus en raison d'un épissage alternatif et d'une glycosylation variable, ce qui peut contribuer à une spécificité de liaison des cytokines sur les différents tissus (Bennett *et al.*, 1995).

L'expression des HSPG est modulée par la génération de produits durant l'inflammation. Les cytokines telles que l'IL1, le TNF $\alpha$ , le TGF $\beta$  et le bFGF stimulent la synthèse de GAG, alors qu'une lésion des cellules endothéliales, une infection virale diminuent cette synthèse (Ihrcke *et al.*, 1993).

#### $\beta$ - A la surface des lymphocytes T

Les lymphocytes synthétisent des GAG sulfatés de type CS et HS, qui peuvent être aussi bien sécrétés que retenus par les cellules. Les GAG trouvés chez les lymphocytes sont en grande partie des chondroitines-4-sulfate (CS-A) et en plus faible quantité des HS, essentiellement portés par la chaîne  $\gamma$  du CMH-II et par le CD44 (Jackson *et al.*, 1995). Au cours de la stimulation, il y a modification de ces GAG : ils apparaissent plus sulfatés et des chondroitines-6-sulfate (CS-C) sont synthétisés. Ces GAG sont également sécrétés ou restent associés aux cellules (Hart, 1982 ; Wilson & Rider, 1991). Les protéoglycannes des lymphocytes sont de masse moléculaire faible, de 100 à 200 kDa, avec des GAG à chaînes courtes et en nombre restreint (Bartold *et al.*, 1989).

De plus, les lymphocytes possèdent des récepteurs membranaires pour l'héparine, tels que le CD45 (Parish & Snowden, 1985) et le CD4 (Lederman *et al.*, 1989). Ces cellules pourraient également fixer spécifiquement à leur surface les HS, et non les CS (Bradbury & Parish, 1989). Ainsi, la rétention d'une partie des HS à la surface des lymphocytes pourrait s'expliquer par la présence de récepteurs à GAG (Wilson & Rider, 1991).

### 3- La phase effectrice

Le rejet d'organe allogénique est lié à l'activation de mécanismes cellulaires dépendant des cellules T. Il fait intervenir différentes cellules effectrices telles que les lymphocytes cytotoxiques (Tyler *et al.*, 1984), les NK, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B. Ainsi la phase effectrice du rejet est soumise à une régulation cellulaire et humorale. 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.

## II- PREVENTION DU REJET DE GREFFE

### A- Le traitement immunosuppresseur

L'azathioprine et les glucocorticostéroïdes ont été pendant longtemps les seuls médicaments immunosuppresseurs efficaces, utilisés dans la prévention du rejet de greffe. Dans les années 80, la découverte de la CsA a permis d'améliorer considérablement la survie des greffons. Azathioprine, corticostéroïdes et CsA constituent actuellement le traitement immunosuppresseur de référence. Un sérum anti-lymphocytaire peut être administré dans le traitement de prévention des transplantations rénale et cardiaque.

L'azathioprine agit comme un inhibiteur compétitif de l'hypoxanthine-guanine-phospho-ribosyl transférase. Il bloque donc la synthèse des bases puriques de l'ARN et de l'ADN, inhibant ainsi la prolifération cellulaire.

Les corticoïdes sont utilisés pour leur activité anti-inflammatoire, bloquant entre autres la prolifération des cellules T et la transcription des cytokines IL6, IL1, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ .

La CsA agit en bloquant l'activation Ca<sup>2+</sup>-dépendante du lymphocyte. Ainsi, elle inhibe l'activité phosphatase de la calcineurine, perturbant l'activation des facteurs transcriptionnels nécessaires à la régulation de l'expression de gènes codant pour certaines cytokines, en particulier l'IL2.

D'autres molécules possèdent une activité immunosuppressive comme l'acide mycophénolique, la désoxyspergoline, le FK506 et la rapamycine. Seuls, ces deux derniers immunosuppresseurs sont actuellement bien étudiés, puisque le mode d'action du FK506 est similaire à celui de la CsA, et la rapamycine, qui bloque la prolifération lymphocytaire induite par les cytokines, pourrait agir en synergie avec la CsA (Schreiber, 1991).

### B- Activités des immunosuppresseurs

#### 1- Immunosuppression par la CsA et le FK506

La CsA et le FK506 inhibent l'activation de gènes de cytokines incluant parmi d'autres, l'IL2, l'INF $\gamma$ , le TNF $\alpha$ , bien qu'*in vitro*, le FK506 reste 10 à 100 fois plus actif que la CsA

(Granelli-Piperno, 1988 ; Tocci *et al.*, 1989 ; Bierer *et al.*, 1990b). L'addition de cytokines exogènes rend les lymphocytes activés insensibles à l'action de la CsA et du FK506, démontrant que ces immunosuppresseurs agissent au niveau de l'étape précoce de l'activation et non au niveau de la prolifération induite par ces cytokines. L'induction des ARNm des "*immediate early genes*", tels que *c-fos* et *c-myc*, et des "*early genes*" tels que celui du récepteur de l'IL2 est moins affectée par ces immunosuppresseurs (Tocci *et al.*, 1989).

Par contre, la CsA a un effet inverse sur la production du TGF $\beta$ . En effet, la CsA stimule l'expression du TGF $\beta$  et de son récepteur chez les lymphocytes T. Le TGF $\beta$  est une cytokine multifonctionnelle qui possède des propriétés immunosuppressive et fibrogénique. Ainsi, l'augmentation de la production et de la fixation du TGF $\beta$  sur son récepteur pourrait contribuer à l'activité du médicament et au phénomène de fibrose observé lors de traitement à la CsA (Ahuja *et al.*, 1995 ; Prashar *et al.*, 1995).

La CsA et le FK506 inhibent la prolifération des cellules T stimulées par la liaison de ligands sur d'autres récepteurs comme le CD2, des lectines ou par l'association ionomycine/PMA. Un point commun de ces voies d'activation est l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire, bien que l'étape sensible à l'immunosuppression soit en aval de cet événement biochimique précoce (Metcalf, 1984 ; Bierer *et al.*, 1991). Les voies de stimulation des lymphocytes T ne passant pas par cette augmentation du taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, telle que la voie CD28, ne sont pas sensibles à l'inhibition par la CsA ou le FK506. Par contre, elles sont sensibles à l'inhibition par la rapamycine (Kay & Benzie, 1990 ; June *et al.*, 1990 ; Bierer *et al.*, 1991). Ainsi, les actions de la CsA et du FK506 sont spécifiques de certaines voies des cellules T.

La CsA et le FK506 inhibent la dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques (Trenn *et al.*, 1989 ; Dutz *et al.*, 1993), des mastocytes, des granulocytes et des neutrophiles (Cirillo *et al.*, 1990 ; Amon, 1992). Ces événements ne nécessitent pas d'activation de gènes, suggérant que la cible de la CsA n'est pas uniquement impliquée dans la régulation de la synthèse de cytokines.

La CsA et le FK506 inhibent également l'apoptose de cellules T induite *in vitro* (Shi *et al.*, 1989 ; Bierer *et al.*, 1991 ; Fruman *et al.*, 1992a) et la sélection des thymocytes *in vivo* (Shi *et al.*, 1989). En effet, les mécanismes de l'apoptose induite par le TCR dépendent d'un processus Ca<sup>2+</sup>-dépendant sensible à la CsA et au FK506. De plus, le développement thymique est altéré chez les animaux traités à la CsA ou au FK506 (Jenkins *et al.*, 1988 ;

Fukuzawa *et al.*, 1989). Ces immunosuppresseurs affecteraient la sélection thymique et le répertoire des cellules T circulantes, en plus d'inhiber l'activation des cellules T matures.

Ainsi, bien que structurellement distincts, le FK506 et la CsA partagent la même capacité à inhiber la voie de transduction du signal caractérisée par une augmentation de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$ . Dans les cellules T, la CsA et le FK506 inhibent plusieurs processus d'activation  $Ca^{2+}$ -dépendants, tels que l'activation de la transcription de gènes de cytokines, la dégranulation et l'induction de l'apoptose, démontrant l'existence d'une cible commune à ces trois phénomènes.

## 2- Immunosuppression par la rapamycine

La rapamycine, analogue structural du FK506, se lie et inhibe l'activité rotamase des FKBP (Bierer *et al.*, 1990a). La rapamycine n'inhibe pas l'activité phosphatase de la calcineurine, ni les cascades de signaux dépendants du taux intracellulaire de  $Ca^{2+}$ , et par conséquent n'inhibe pas la transcription de cytokines par les cellules T et l'apoptose de cellules T. Par contre, la rapamycine peut inhiber la prolifération des cellules T induite par l'IL2, même ajoutée après 12 h d'activation, alors que le FK506 n'est effectif que s'il est ajouté dans les premières heures (Dumont *et al.*, 1990).

La fixation des lymphokines à la surface des cellules T n'est pas inhibée par la rapamycine alors que le signal de transduction induit par cette fixation est bloqué. Ainsi, la rapamycine inhibe, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, la prolifération dépendante de facteurs de croissance (Bierer *et al.*, 1990b ; Dumont *et al.*, 1990). La rapamycine, agissant à un stade de la prolifération plus tardif par rapport à la CsA et au FK506, empêche la progression des lymphocytes T vers la phase S.

Les effets de la rapamycine ne sont pas limités aux cellules T. Certains travaux ont montré les effets de la rapamycine sur d'autres cellules lymphoïdes et non-lymphoïdes. Elle inhibe la prolifération des lymphocytes B (Kay *et al.*, 1991 ; Morris, 1992), ainsi que celle des hépatocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes. Il semblerait donc que la rapamycine altère une voie de régulation de la croissance cellulaire commune à de nombreux types cellulaires.

## C- Mécanisme moléculaire des immunosuppresseurs

### 1- Les complexes immunophiline/immunosuppresseur

#### *a. L'activité immunosuppressive est indépendante de l'activité PPIase*

Comme la CsA et le FK506 se fixent aux immunophilines, il avait tout d'abord été proposé que les effets immunosuppresseurs de ces médicaments étaient liés à l'inhibition de l'activité rotamase de leurs récepteurs intracellulaires. Cependant, cette hypothèse s'est avérée erronée à la suite d'études plus avancées :

- Les doses thérapeutiques de la CsA et du FK506 utilisées pour prévenir le rejet de greffe sont nettement plus faibles que celles nécessaires pour saturer leurs récepteurs intracellulaires et inhiber totalement leur activité PPIase. En effet, les concentrations en CsA et FK506 utilisées pour inhiber la transcription du gène de l'IL2 ne correspondent qu'à 1% de celles des CyPs et FKBP (Schreiber, 1991 ; Sigal & Dumont, 1992).

- La CsA et le FK506 inhibent respectivement les activités des CyPs et des FKBP et tous deux bloquent l'activation du lymphocyte T. Or, si les cellules sont incubées avec la CsA, l'activité PPIase des FKBP n'est pas inhibée et pourtant il y a bien immunosuppression. Il en est de même avec le FK506 vis à vis de l'activité PPIase des CyPs. Cette observation démontre que l'activité rotamase 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 distincts, bien qu'ils inhibent tous les deux l'activité rotamase des FKBP. Le FK506 et la rapamycine agissent comme antagonistes réciproques (Bierer *et al.*, 1990b ; Dumont *et al.*, 1990). En effet, la rapamycine empêche l'inhibition de la production d'IL2 par le FK506 dans les lymphocytes T, et le FK506 bloque les effets inhibiteurs de la rapamycine sur la prolifération dépendante de facteurs de croissance.

- Certains analogues de FK506, rapamycine et CsA pouvant se fixer et inhiber l'activité PPIase des FKBP et des CyPs, n'ont pas d'activité immunosuppressive, démontrant que l'activité PPIase et l'immunosuppression sont deux fonctions différentes impliquant la même molécule (Bierer *et al.*, 1990a ; Sigal *et al.*, 1991 ; Dumont *et al.*, 1992).

- La distinction entre activité PPIase et activité immunosuppressive a été apportée par des expériences sur des organismes inférieurs. Chez *S. cerevisiae*, la CsA et le FK506 sont toxiques. Cependant, les levures présentant des délétions au niveau des gènes des

immunophilines sont encore viables et continuent à croître dans des conditions normales (Tropshug *et al.*, 1989 ; Heitman *et al.*, 1991). Il semble donc que les activités PPIases ne soient pas indispensables à la survie des eucaryotes inférieurs, et que l'effet létal des immunosuppresseurs sur les levures n'est pas uniquement dû à la perte de l'activité PPIase mais à l'apparition d'une nouvelle activité en présence d'immunosuppresseur.

Ainsi l'inhibition de l'activité rotamase seule des immunophilines n'est pas suffisante pour expliquer l'action des médicaments.

*b. L'activité immunosuppressive est dépendante de la formation des complexes immunosuppresseur/immunophiline*

Toutefois la formation du complexe immunosuppresseur/immunophiline reste une étape indispensable à l'activité immunosuppressive de ces médicaments :

- Le 506BD, analogue structural de la rapamycine et du FK506, se fixe à la FKBP12 et inhibe son activité PPIase mais ne possède aucune activité immunosuppressive. Cependant, il agit comme antagoniste vis à vis des activités du FK506 et de la rapamycine (Bierer *et al.*, 1990a). Des résultats similaires ont été obtenus avec la [MeAla<sup>6</sup>]-CsA qui en se fixant aux CyPs entre en compétition avec la CsA et supprime ses effets inhibiteurs (Sigal *et al.*, 1991). Ces résultats distinguent la capacité à inhiber l'activité PPIase de l'activité immunosuppressive et suggèrent aussi que le FK506, la rapamycine et la CsA doivent se fixer aux FKBP et aux CyPs pour exercer leur effet immunosuppresseur.

- L'utilisation de composés bifonctionnels, permettant un pontage covalent entre la CsA, les CyPs et la calcineurine, montre que la CsA seule se fixe bien aux CyPs mais pas à la calcineurine. Par contre, en présence de CyPs, une interaction calcineurine/CsA est détectable (Ryffel *et al.*, 1993).

- Les CyPs complexées à la CsA font intervenir des résidus des deux molécules pour former un motif composite reconnu par la calcineurine (Etzkorn *et al.*, 1994). Le complexe FKBP/FK506 formerait un motif composite présentant une homologie conformationnelle avec celui du complexe CyP/CsA, ce qui expliquerait que ces deux complexes se fixent à la même protéine bien que individuellement les immunophilines et les immunosuppresseurs ne présentent respectivement aucune homologie entre eux.

- De même, des expériences de mutations des gènes *FKB1* (Koltin *et al.*, 1991 ; Foor *et al.*, 1992) ou *CYP1* chez la levure (Tropschug *et al.*, 1989) rendent ces souches résistantes aux

FK506, rapamycine et CsA. Ces résultats confirment la nécessité de la formation d'un complexe immunophiline/immunosuppresseur dans l'activité immunosuppressive des médicaments.

Ainsi, ces immunosuppresseurs, CsA, FK506 et rapamycine, agissent en formant un complexe avec leurs immunophilines intracellulaires respectives pour moduler l'activité d'une molécule cruciale du signal de transduction.

### *c. Les immunophilines impliquées dans l'immunosuppression*

Les isoformes des immunophilines associées à l'activité immunosuppressive de la CsA et du FK506 dans les cellules de mammifères et chez la levure ont été étudiées :

- La transfection et la surexpression de la CyPA ou de la CyPB dans les cellules T Jurkat augmentent la sensibilité au médicament, suggérant que la CyPA ou la CyPB peuvent être associées aux effets de la CsA. Si ces résultats sont compréhensibles pour la CyPA en raison de sa localisation cytosolique, l'implication de la CyPB est plus surprenante étant donné sa compartimentation. 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 protéine agissait sur l'activité de la calcineurine par une voie indirecte. En effet, Bram & Crabtree (1994) ont montré qu'au cours de l'activation du lymphocyte, la CyPB interagit avec la CAML (*Calcium-signal Modulating cyclophilin Ligand*), régulant l'induction des flux calciques et l'activation de la calcineurine. Alors que le complexe CyPC/CsA se fixe et inhibe *in vitro* l'activité de la calcineurine, il n'est pas associé à l'immunosuppression *in vivo*, probablement en raison de sa localisation dans le réticulum endoplasmique, compartiment ne permettant pas une interaction physique entre la CyPC et la calcineurine cytosolique. 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 (Bram *et al.*, 1993).

- Des expériences similaires ont permis d'identifier les isoformes des FKBP impliquées dans l'activité immunosuppressive du FK506. Seule la FKBP12 peut être associée à l'activité du FK506. En effet, ni la FKBP13, localisée dans le réticulum endoplasmique, ni la FKBP25,

localisée dans le noyau, ne peuvent interagir physiquement avec la calcineurine (Bram *et al.*, 1993).

- L'isoforme des FKBP12 nécessaire à l'activité de la rapamycine pourrait être la FKBP12. En effet, chez la levure les effets antiprolifératifs de la rapamycine sont induits par l'homologue FKBP1 de la FKBP12. De plus, la délétion du gène *FKBP1* rend ces cellules résistantes à la rapamycine (Koltin *et al.*, 1991).

Ainsi, les immunosuppresseurs seuls ne seraient que des pro-médicaments. Une fois liés à leurs immunophilines respectives, les complexes pourraient s'associer avec une autre molécule cible dans la cellule et devenir alors effectifs.

## 2- Cibles des complexes immunophiline/ immunosuppresseur

Les complexes CsA/CyPs et FK506/FKBPs inhibent l'activation des lymphocytes en bloquant la transmission d'évènements précoces dans la cellule. Des travaux ont montré l'implication dans ces phénomènes d'une phosphatase, la calcineurine. Le complexe rapamycine/FKBP ne modifie pas l'activité de la calcineurine. Cependant, le traitement à la rapamycine affecte les activités d'autres molécules du signal intracellulaire, incluant la p70 S6 kinase, la cdc2 kinase et la cdk2 kinase. La cible directe du complexe rapamycine/FKBP reliant ces activités serait une protéine à activité PI-4 kinase.

### *a. La calcineurine, cible des complexes CsA/CyPA et FK506/FKBP12*

La CsA et le FK506, de structures différentes et se fixant à des immunophilines de familles différentes, partagent le même spectre d'action avec la même protéine cible : la calcineurine.

#### $\alpha$ - Mise en évidence

En 1991, Liu *et al.* ont montré que les complexes CsA/CyP et les complexes FK506/FKBP se lient à la sérine/thréonine phosphatase  $Ca^{2+}$ -, calmoduline- dépendante. Le médicament seul, les immunophilines seules, ou le complexe FKBP12/Rapamycine ne se lient pas à la calcineurine. De plus, Friedman & Weissman (1991) ont démontré que le complexe CyPC/CsA se lie *in vitro* à deux protéines, identifiées aux sous-unités de la calcineurine.

La calcineurine est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique de 59 à 61 kDa (CnA), qui contient l'activité enzymatique et le site de fixation de la calmoduline, et d'une sous-unité régulatrice de 19 kDa (CnB). Des expériences de délétion de certaines séquences de la CnA ont permis de mieux visualiser le site d'interaction entre la

calcineurine et les complexes CyP/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 CnA est directement impliqué dans les interactions. La présence de la CnB 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 CnA interagissant directement avec les complexes CyP/CsA a pu être localisée. Ce domaine contient le site d'interaction avec la CnB, confirmant sa présence nécessaire dans les interactions avec les complexes CyP/CsA (Husi & Zurini, 1994).

D'autres arguments sont en faveur avec l'hypothèse que la calcineurine est la cible sensible à la CsA et au FK506 dans les cellules T :

- Des analogues non-immunosuppresseurs de la CsA et du FK506, comme la [MeAla<sup>6</sup>]-CsA, le 506BD ou le L-685,818, n'inhibent pas l'activité phosphatase de la calcineurine, malgré leur fixation aux immunophilines, corrélant la nécessité de l'inhibition de l'activité de la calcineurine pour l'immunosuppression (Liu *et al.*, 1991 ; Dumont *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1992 ; Nelson *et al.*, 1993). L'inverse est également vrai : des analogues de la CsA, comme la [MeBm<sub>2</sub>t<sup>1</sup>]-CsA, fixant faiblement les CyPs mais fixant avec une forte affinité la calcineurine, conservent leur activité immunosuppressive (Liu *et al.*, 1992 ; Nelson *et al.*, 1993).

- La DI<sub>50</sub> (concentration en médicament nécessaire pour avoir 50% d'inhibition de l'activité mesurée) du FK506 et de la CsA pour inhiber l'activité de la calcineurine est corrélée avec la DI<sub>50</sub> de l'inhibition de la production de l'IL2 (Fruman *et al.*, 1992b), de l'apoptose (Fruman *et al.*, 1992a) et de la dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques (Dutz *et al.*, 1993).

- La surexpression de la calcineurine dans les cellules de la lignée T Jurkat résulte en une diminution de sensibilité à la CsA et au FK506 (Clipstone *et al.*, 1992 ; O'Keefe *et al.*, 1992).

- La rapamycine n'inhibe pas l'activité de la calcineurine mais déplace l'inhibition par le FK506 (Fruman *et al.*, 1992b).

- Enfin, le traitement de cellules par la CsA ou le FK506 inhibe uniquement l'activité phosphatasique de la calcineurine et non celle d'autres sérine/thréonine phosphatases telles que la PP1, la PP2A et la PP2C (Fruman *et al.*, 1992b).

### β - Mode d'action moléculaire de la CsA et du FK506

La calcineurine possède une activité phosphatase  $\text{Ca}^{2+}$ -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 sa déphosphorylation *in vivo* (McCaffrey *et al.*, 1993a). Ce facteur joue un rôle clé dans l'expression de l'IL2, 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 la translocation du NF-ATc du cytosol vers le noyau. C'est en inhibant l'étape cruciale de déphosphorylation du NF-ATc que la CsA et le FK506 inhibent les processus permettant sa translocation dans le noyau et inhibent son activité transcriptionnelle (Flanagan *et al.*, 1991 ; Liu *et al.*, 1992).

Les facteurs de transcription Oct-1 et NFκB sont également sensibles à la CsA et au FK506, et représentent des cibles potentielles de la calcineurine (Mattila *et al.*, 1990 ; Randak *et al.*, 1991).

Dans les lymphocytes T, l'inhibition de la dégranulation et de l'apoptose est corrélée à l'inactivation de la calcineurine (Fruman *et al.*, 1992a). 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 être déterminé (Bonnefoy-Berard *et al.*, 1994).

#### *b. La cible du complexe FKBP12/rapamycine*

##### α - Les activités kinases inhibées par la rapamycine

Bien que l'activation des PTKs et des MAP kinases soient des événements précoces associés à plusieurs récepteurs de facteurs de croissance, l'activité de ces kinases apparaît non affectée par la rapamycine (Price *et al.*, 1992). Un événement plus tardif dans ces voies de transduction est la phosphorylation et l'activation des S6 kinases, qui phosphorylent la

protéine S6 du ribosome 40S impliquée dans l'initiation de la traduction des ARNm. Deux familles de S6 kinases sont connues : la famille des p85 (rsk) et des p70. La rapamycine ne bloque que la phosphorylation et l'activation de la p70 S6 kinase et non celle de la p85 S6 kinase (Kuo *et al.*, 1992 ; Terada *et al.*, 1992). Dans les cellules T, la rapamycine inhibe l'activation de la p70 S6 kinase induite par l'IL2 à des concentrations identiques à celles nécessaires pour inhiber la prolifération. L'activité de la p70 S6 kinase apparaît être importante pour la prolifération cellulaire. En effet, la croissance de fibroblastes est inhibée par microinjection d'anticorps bloquants de la p70 S6 kinase (Lane *et al.*, 1993).

Le traitement à la rapamycine inhibe également l'activation de la p34<sup>cdc2</sup> kinase, protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire (Morice *et al.*, 1993), l'activation de cdk2 (*cyclin-dependent kinase2*) et la formation des complexes fonctionnels cyclineD/cdk2 dans la lignée cellulaire d'osteosarcome (Albers *et al.*, 1993). Cependant il n'est pas encore connu si ces cibles sont des composants d'un signal commun ou si elles mènent à des voies différentes faisant intervenir la cible directe de la rapamycine.

Ces résultats suggèrent que le complexe rapamycine/FKBP n'interagit pas directement avec la p70 S6 kinase, la p34<sup>cdc2</sup> kinase, ni avec le complexe cycline D/cdk2. Il est possible que la cible directe de la rapamycine soit une kinase ou une phosphatase en amont qui régulerait la phosphorylation de la p70 S6 kinase et de la p34<sup>cdc2</sup> kinase.

#### β - Cible potentielle de la rapamycine

Chez *S. cerevisiae*, la rapamycine provoque comme chez le lymphocyte T, un arrêt du cycle cellulaire et empêche la progression vers la phase S. La levure possède également la calcineurine et les analogues des FKBP et des CyPs des mammifères codés par les gènes *FKB1* et *CYP1*. Ce qui fait de la levure un bon modèle pour étudier les voies inhibées par la rapamycine dans le lymphocyte (Cardenas *et al.*, 1994).

Des études génétiques chez la levure, ont permis d'impliquer les produits des gènes *TOR1* et *TOR2* (*Target Of Rapamycin*) comme cibles du complexe FKBP/rapamycine. Des mutations des gènes *TOR1* et *TOR2* confèrent une résistance à la rapamycine (Lorenz & Heitman, 1995). De plus, des expériences de non complémentation non-alléliques réalisées entre des mutations de *TOR2* et *FKB1* en présence de rapamycine, suggèrent une interaction directe entre le complexe rapamycine/FKBP12 et *TOR2* (Kunz *et al.*, 1993).

Les gènes *TOR1* et *TOR2* ont été clonés et présentent de fortes homologies de séquences entre eux (67% d'identité) (Cafferkey *et al.*, 1993 ; Kunz *et al.*, 1993). *TOR2* est essentiel à la

survie de la levure alors que *TOR1* ne l'est pas. Les domaines C-terminaux des protéines TOR partagent des séquences similaires avec des enzymes de mammifères qui phosphorylent des phosphatidyl-inositols, en particulier la sous-unité catalytique de la PI-3 kinase et la PI-4 kinase (Hiles *et al.*, 1992 ; Flanagan *et al.*, 1993). Par immunoprécipitation, Cardenas & Heitman (1995) ont montré que TOR2 possède une activité PI-4 kinase, activité non inhibée par la fixation du complexe FKBP/rapamycine.

De récentes études ont permis d'identifier l'homologue mammifère de TOR (mTOR), aussi appelé RAFT1 (*Rapamycine and FKBP12 target-1*), FRAP (*FKBP-rapamycine-associated protein*). mTOR partage 39 et 46% de séquence identique avec les protéines TOR de la levure et fixe le complexe rapamycine/FKBP12 (Brown *et al.*, 1994 ; Sabatini *et al.*, 1994 ; Sabers *et al.*, 1995).

De même que TOR2, mTOR possède une activité PI-4 kinase non inhibée par le complexe FKBP12/rapamycine (Sabatini *et al.*, 1995). Le complexe FKBP12/rapamycine pourrait cependant affecter l'activité PI-kinase en altérant la localisation intracellulaire de cette enzyme et empêcher l'accès à ses substrats lipidiques, les PI-3-P localisés à la membrane. Ce complexe pourrait également inhiber des modifications post-translationnelles de mTOR, telles que des phosphorylations qui seraient nécessaires à son activité.

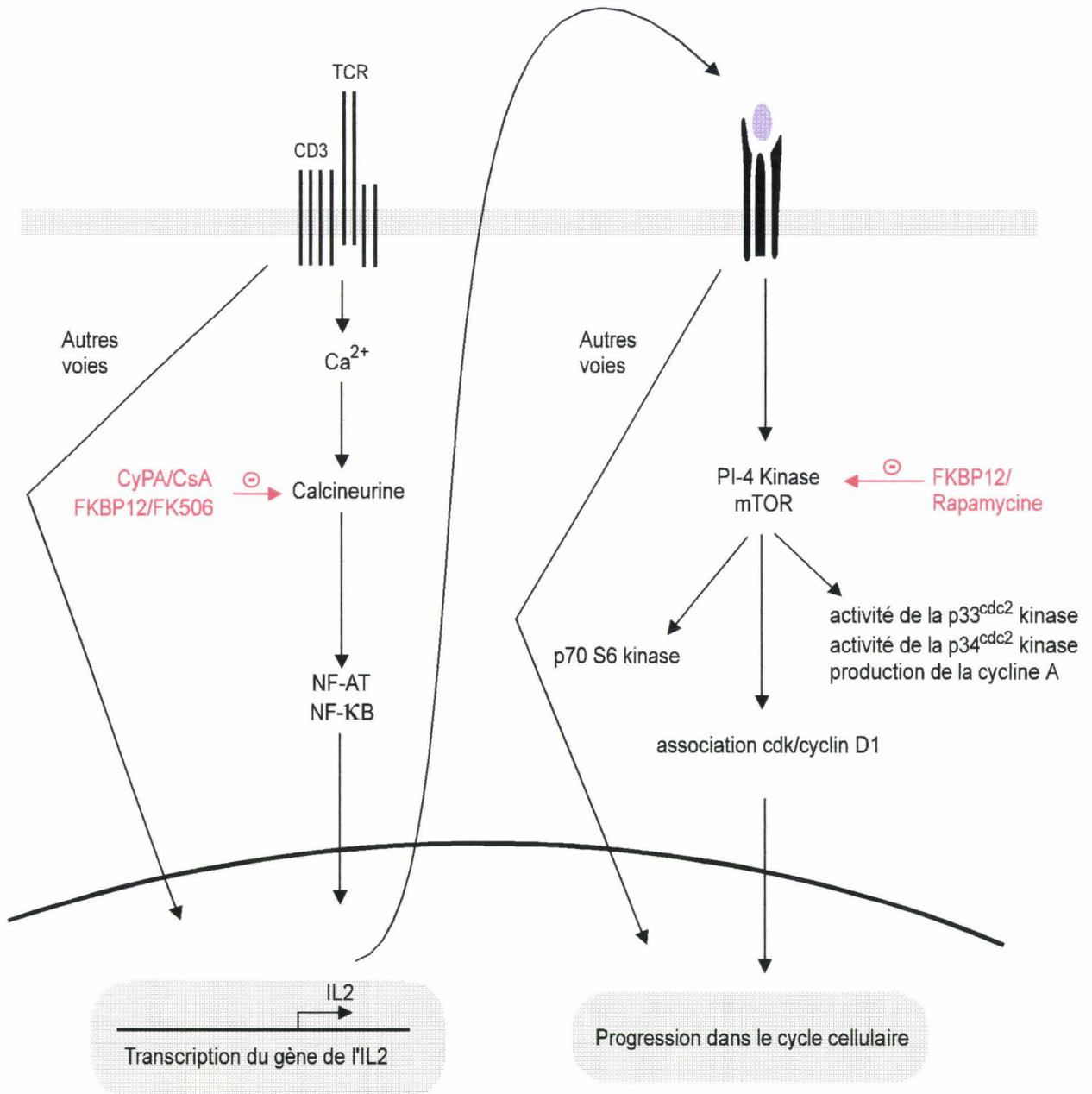
Dans les cellules de mammifère, trois candidats ont été identifiés pour être les cibles en aval de l'activité de TOR. Le traitement à la rapamycine empêche en effet l'activation de la p70 S6 kinase, celle de la p34<sup>cdc2</sup> kinase et l'association des complexes cycline D/cdk2.

Les études sur la rapamycine et les fonctions de mTOR permettront de dévoiler une cascade de signaux de transduction régulant la progression de la cellule dans le cycle, qui est conservée de la levure à l'Homme.

Les modes d'actions des 3 immunosuppresseurs sont résumés dans la Figure 9.

### III- HETEROGENEITE DE LA REPONSE A LA CSA

L'utilisation clinique de la CsA est compliquée par une grande variabilité intra- et interindividuelle dans sa pharmacocinétique. De plus, sa faible marge thérapeutique ainsi que le risque de nombreuses interactions médicamenteuses rendent nécessaire un suivi thérapeutique chez les malades traités par ce médicament. Plusieurs facteurs contribuent à l'hétérogénéité de la réponse à ce médicament.



**Figure 9 : Cibles de la CsA, du FK506 et de la rapamycine dans l'inhibition de la synthèse de l'IL2 et la prolifération lymphocytaire.**

Dans ce chapitre, nous nous limiterons à la CsA couramment utilisée en clinique et dont les données pharmacologiques sont bien décrites dans la littérature. Au contraire, le FK506 et la rapamycine sont au stade d'essais cliniques ou précliniques.

## **A- Pharmacocinétique et métabolisme**

### 1- Absorption

La CsA est habituellement administrée par voie orale (Sandimmun, ®), à raison de 6 à 15 mg/kg/jour, en association avec de l'huile de ricin polyoxyéthylénée, le Crémophor.

Son absorption intestinale est lente, incomplète et très variable d'un individu à un autre. Elle nécessite la présence de sels biliaires et elle est modifiée dans le cas d'une mauvaise fonction hépatique. Le pic de concentration dans le sang ou le plasma est maximale entre 1 et 6 heures après la prise orale.

### 2- Distribution

#### *a. Distribution dans les tissus*

Sa distribution est rapide avec une concentration tissulaire élevée pour les tissus adipeux, le foie et les reins. Les organes riches en leucocytes tels que thymus, moelle osseuse, rate ont également une concentration en CsA supérieure à celle mesurée dans le sang. Par contre, la concentration en CsA mesurée dans le cerveau est inférieure à la concentration sanguine, ce qui indique que la CsA ne pénètre pas la barrière hémato-encéphalique (Lindholm, 1991a).

#### *b. Distribution dans le sang et le plasma*

##### $\alpha$ - Liaison érythrocytaire

La CsA circulante se distribue dans les différents compartiments du sang (Figure 10). On la retrouve de façon prépondérante (60%) dans les globules rouges. Ce pourcentage reste constant dans la gamme des concentrations thérapeutiques jusqu'à 1000 ng/ml. Au delà, le rapport sang/plasma évolue de façon non linéaire en raison d'un phénomène de saturation des hématies. La protéine responsable du mécanisme de saturation érythrocytaire est la CyPA. Cette fixation dépendante de la température présente un Kd de 100 nM (Foxwell *et al.*, 1988a).

### β - Liaison aux protéines plasmatiques

33% de la CsA circulante dans le sang sont fixés sur les protéines plasmatiques (Lindholm, 1991a ; Barre, 1992) dont 27,5% sur les lipoprotéines, ce qui représente dans le plasma :

- 85 à 90% de la CsA sont fixés sur les lipoprotéines. Parmi les lipoprotéines, la majorité de la CsA est associée aux HDL.

- 5 à 15% sont fixés sur les autres protéines essentiellement l'albumine. Récemment Allain *et al.* (1995) ont mis en évidence la présence d'une CyPB sécrétée dans le plasma à une concentration de  $150 \pm 80$  ng/ml, ce qui suggère que le complexe CyPB/CsA pourrait être la forme disponible du médicament pour les cellules.

### γ - Liaison aux autres cellules du sang

Les proportions de CsA liée aux polymorphonucléaires et aux lymphocytes sont respectivement de 4 et 5 % (Barre, 1992). Les concentrations de CsA dans les cellules mononucléées sont 1000 fois plus importantes que dans les hématies. Les phénomènes de saturation dans ces cellules ne commencent à survenir que pour des concentrations supérieures à 8000 ng/ml (Lindholm, 1991a). La fixation intralymphocytaire est réversible et est caractérisée par une capacité de fixation de  $7 \text{ pmol}/10^6$  cellules (Ryffel *et al.*, 1982) et une constante de dissociation  $K_d$  de 100 nM. La quantité de CsA circulante localisée dans les lymphocytes est négligeable en regard de celle présente dans les érythrocytes mais elle est déterminante puisque seule cette fraction est responsable de l'activité immunosuppressive. Dans les cellules, la CsA se répartit dans les fractions membranaire (Legrue *et al.*, 1983), cytosolique et nucléaire :

→ Récepteurs membranaires de la CsA :

- Des études comparées de fixation et d'incorporation de la CsA dans des liposomes et des lymphocytes ne permettaient pas de conclure en l'existence de récepteurs spécifiques et suggéraient que le médicament diffusait passivement à travers la bicouche lipidique en raison de sa nature lipophile (Legrue *et al.*, 1983). Toutefois, Cacalano *et al.* (1992) et Erlanger *et al.* (1992) suggèrent que la CsA entre dans la cellule par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire. Par l'utilisation d'un dérivé macromoléculaire hydrosoluble de la CsA, ils ont montré que les lymphocytes T et B, les thymocytes et les cellules de lignées T lymphoblastiques s'agglutinent spécifiquement alors qu'aucune agglutination n'est observée avec des cellules épithéliales HeLa, Vero et Cos. Cette agglutination est inhibée par un

décapage membranaire à la trypsine, par un excès de CsA libre ou par des anticorps anti-CsA. Cependant, aucune protéine correspondant à ce récepteur n'a pu être caractérisée à la surface des lymphocytes.

- La CsA se fixe à la P-glycoprotéine de 170 kDa (P-gp ou gp170) (Foxwell *et al.*, 1989). La P-gp est surtout représentée à la surface des cellules cancéreuses et normalement présente à la surface des hépatocytes, des cellules du rein et des cellules mononucléées du sang en quantité variable en fonction des différentes populations (Chaudhary *et al.*, 1992). La P-gp codée par le gène *mdr-1* (*multidrug resistant*) agit en expulsant hors de la cellule les substances hydrophobes comme les anti-cancéreux et la CsA, phénomène appelé MDR pour *Multidrug resistance*. La fonction MDR est elle-même inhibée par la CsA ce qui explique son utilisation en temps qu'agent révertant dans le traitement anti-cancéreux *in vitro* et en thérapie clinique (Tamai & Safa, 1991). Des auteurs ont cependant montré que le traitement à la CsA augmentait l'expression de la P-gp à la surface des cellules MDCK (cellules de tubules rénaux de chien). Ces résultats suggèrent que la CsA pourrait favoriser un mécanisme de détoxification (del Moral *et al.*, 1995).

→ Récepteurs intracellulaires de la CsA:

La CsA interagit avec de nombreuses protéines intracellulaires, mais la plupart de ces récepteurs ne sont pas spécifiques. En effet, la calmoduline (Colombani *et al.*, 1985 ; Foxwell *et al.*, 1988b), l'actine et l'hsp70 (Moss *et al.*, 1992) fixent la CsA ainsi que ses analogues non immunosuppresseurs avec des affinités semblables. De plus, la quantité d'immunosuppresseurs nécessaire pour bloquer l'activité de la calmoduline est très supérieure à celle utilisée en immunosuppression (Legrue *et al.*, 1986 ; Foxwell *et al.*, 1988b).

Mais les récepteurs prioritaires de la CsA sont bien sûr les CyPs. Elles sont représentées dans tous les compartiments cellulaires par des isoformes différentes et peuvent donc influencer la distribution et l'activité du médicament.

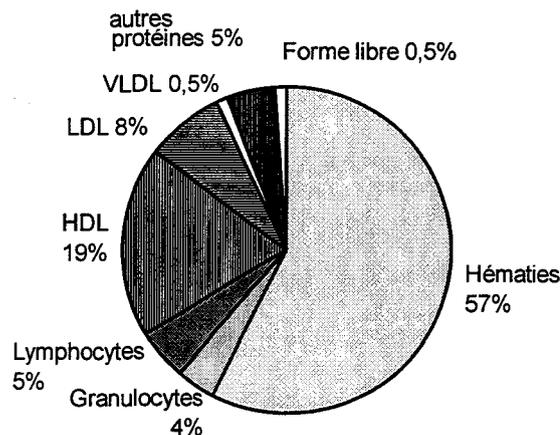
#### δ - Forme libre

Seule une faible fraction, environ 0.5%, de la CsA circulante se trouve sous forme libre dans le plasma (Lindholm, 1991a ; Barre, 1992).

### 3- Métabolisme

La CsA est métabolisée dans le foie par plusieurs isoenzymes du cytochrome P450 et est principalement éliminée par voie biliaire. Le métabolisme de la CsA est dépendant du

NADPH. Les réactions impliquées sont des hydroxylations et des N-déméthylations, des cyclisations et des oxydations. La plupart des métabolites deviennent inactifs et ne contribuent pas aux effets cliniques de la CsA (Kronbach *et al.*, 1988).



**Figure 10 : Distribution de la CsA dans le sang total (Lindholm, 1991a)**

## **B- Marge thérapeutique**

La fourchette thérapeutique de ce médicament, en considérant le taux résiduel, est comprise entre 50 et 300 ng/ml. Celle-ci peut varier en fonction du type de transplantation et de son ancienneté. Des doses inférieures font encourir un risque de rejet alors que des doses élevées font craindre des manifestations de toxicité.

Comme toute molécule très active, la CsA induit des effets secondaires indésirables. Mais avec le recul, sa toxicité est mieux connue et contrôlée.

- La dysfonction rénale constitue l'effet secondaire majeur et incontournable de ce médicament. Les deux formes de toxicité, aiguë et chronique, dépendent directement de la dose. La dysfonction aiguë provoque une altération de la fonction rénale et est totalement

réversible lors de la diminution de la dose. Cette néphrotoxicité est le résultat d'une vasoconstriction pré- et post-glomérulaire déclenchée par une augmentation de la production de thromboxane A<sub>2</sub> et d'endothéline. La toxicité chronique, la plus grave, provoque des lésions vasculaires et des altérations morphologiques des tubules rénaux d'où une hypertension. Le surdosage chronique (doses cumulatives élevées) semble jouer un rôle important dans l'apparition de ce type de toxicité.

- L'hypertension artérielle est aussi fréquente chez les transplantés sous CsA.
- La dysfonction hépatique, rare et réversible, survient à de fortes doses de médicaments.
- D'autres effets secondaires sont observés comme l'hyperplasie gingivale, l'hirsutisme.

La survenue d'une neurotoxicité avec crises convulsives sont plus rares. A l'opposé, l'atteinte neurologique périphérique est fréquente surtout en cas de surdosage (tremblements...).

- Quant à l'augmentation des risques infectieux, et du risque de néoplasies telles que leucémies, lymphomes B, elle est plus en relation avec le niveau global d'immunosuppression que du fait de la CsA.

Certains médicaments peuvent avoir des conséquences sur le traitement à la CsA. En effet, certaines interactions médicamenteuses peuvent perturber le métabolisme de la CsA entraînant d'éventuels sous-dosages et faisant encourir un risque de rejet ou des sur-dosages potentialisant sa toxicité.

Cette variabilité impose que pour chaque patient soit définie une fourchette thérapeutique, au sein de laquelle l'efficacité maximale soit obtenue pour un risque minimum (Lindholm, 1991b).

## **C- Variations de sensibilité à la CsA**

Outre une marge thérapeutique étroite, la CsA montre des variations de sensibilité inter- et intra-individuelles. Cette hétérogénéité de sensibilité peut intervenir à plusieurs niveaux. Elle peut être due à une susceptibilité différente de la cellule cible, en l'occurrence le lymphocyte T, ou à des différences de disponibilité du médicament.

### 1- Sensibilité inter-individuelle à la CsA

Une hétérogénéité de la réponse lymphocytaire à l'effet immunosuppresseur de la CsA a été constaté lors du traitement des transplantés et rapportés dans des études *in vitro* (Sander *et al.*, 1986 ; Bowes *et al.*, 1989 ; Povlsen *et al.*, 1990). La réponse lymphocytaire est mesurée *in*

*in vitro* par estimation de la dose nécessaire pour inhiber à 50% (DI50) la prolifération des lymphocytes, l'expression de l'IL2 et l'apparition de marqueurs membranaires tels que le CD25, induites par un alloantigène ou un anticorps anti-CD3. Les DI50 mesurées vont de 10 ng/ml à plus de 1000 ng/ml de CsA. Récemment, Masy *et al.* (1994) ont établi trois groupes d'individus classés arbitrairement en fonction de leur réponse à la CsA. 60% sont considérés comme "bons répondeurs" avec une DI50 < 200ng/ml de CsA, 20% comme "répondeurs intermédiaires" avec 200 < DI50 < 400 ng/ml et 20% comme "résistants" avec une DI50 > 400ng/ml. Cette hétérogénéité de la réponse à la CsA pourrait s'expliquer par une variabilité d'incorporation du médicament dans les lymphocytes, observée par Povlsen *et al.* (1990) mais celle-ci n'est pas corrélée avec son activité immunosuppressive. D'autres facteurs cellulaires et extracellulaires doivent donc intervenir.

## 2- Sensibilité intra-individuelle à la CsA

### *a. Phénotype lymphocytaire de la réponse*

Même si la CsA agit sur les lymphocytes T, tous ne sont pas sensibles de la même façon au médicament. En effet, les lymphocytes T sont très hétérogènes chez un même individu, tant au niveau de leur degré de maturation que de leur activité.

Au niveau de la maturation, on oppose le lymphocyte naïf au lymphocyte éduqué qui se distingue par des critères phénotypiques et fonctionnels, en particulier au niveau de la diversification de sécrétion des interleukines et une réactivité plus grande à la restimulation pour les lymphocytes éduqués (Akbar *et al.*, 1991). Chez les lymphocytes T, les cellules naïves expriment l'isoforme CD45RA, alors que les lymphocytes mémoires expriment le CD45RO. Les cellules CD4/CD45RA caractérisent les cellules inductrices de suppression alors que les cellules CD4/CD45RO aident à la synthèse d'immunoglobulines par les lymphocytes B. La CsA inhiberait davantage les cellules naïves, dont leur prolifération est dépendante de l'IL2, que les cellules mémoires qui ont diversifiées leur panel de production d'interleukines et ne sont plus dépendantes de l'IL2 (Byrne *et al.*, 1988).

En ce qui concerne les lymphocytes T CD8, ils se distinguent en cellules cytotoxiques et en cellules suppressives. La CsA agirait sur les lymphocytes T CD8 cytotoxiques en inhibant la prolifération dépendante de l'IL2 mais aussi en inhibant l'exocytose de leurs granules (Ferrini *et al.*, 1986 ; Trenn *et al.*, 1989). Elle serait par contre, sans effet sur les lymphocytes T CD8 à activité suppressive (Bucy *et al.*, 1988).

### *b. Voies de transduction impliquées dans l'activation des lymphocytes*

#### $\alpha$ - Voies sensibles à la CsA

Par surexpression de la calcineurine, les cellules deviennent résistantes à la CsA, suggérant que le taux faible de cette enzyme dans les lymphocytes peut être en partie responsable de l'action sélective de la CsA (O'Keefe *et al.*, 1992 ; Clipstone & Crabtree, 1992). Toutefois, certains types cellulaires exprimant des taux semblables de calcineurine ne présentent pas la même sensibilité à la CsA que les cellules T. Mais il faut distinguer activité enzymatique et abondance protéique. En effet, dans le cerveau et le foie, organes riches en calcineurine, l'activité phosphatase est plus faible que dans la rate et le thymus (Katagiri *et al.*, 1993).

Enfin, la sélectivité d'action de la CsA pourrait s'expliquer par la présence sélective dans les cellules lymphoïdes du NF-AT, substrat de la calcineurine (Mc Caffrey *et al.*, 1993b). Cependant, la calcineurine, de répartition ubiquitaire, possède d'autres substrats non sélectifs qui pourraient être potentiellement inhibés par la CsA.

D'autres voies de transduction, comme la voie impliquant la PKC $\beta$ , sont également sensibles à la CsA. Cette voie, conduisant à la formation d'acides gras polyinsaturés comme second messager, est entièrement inhibée par 200 ng/ml de CsA (Szamel *et al.*, 1993). Elle est également impliquée dans la transmission du gène de l'IL2, ce qui en fait une voie parallèle à celle de la calcineurine.

#### $\beta$ - Voies résistantes à la CsA

Certaines voies de transduction sont connues pour être insensibles à la CsA. Les voies faisant intervenir la PKC $\alpha$  et les sérine/thréonine phosphatases autres que la calcineurine ne sont pas affectées par la CsA (Fruman *et al.*, 1992b ; Liu *et al.*, 1992). De même, le signal induit par l'engagement du CD28 n'est pas bloqué par la CsA. Le facteur de transcription CD28RC n'apparaît que lors d'une co-stimulation CD3/CD28. La voie CD28 augmente la réponse proliférative des lymphocytes en augmentant la stabilité des ARNm des interleukines et en augmentant le taux de transcription du gène de l'IL2 et d'autres interleukines. De plus, elle augmente la résistance des cellules à l'action de la CsA (Fraser *et al.*, 1991). Ainsi les différences individuelles de réponse peuvent donc se situer, soit au niveau de la représentation des sous-populations CD28<sup>+</sup> parmi les lymphocytes T, soit au niveau de la densité d'expression du CD28 ou de son contre-recepteur (B7/BB1) à l'état basal ou après stimulation, soit au niveau de la signalisation, notamment une intensité différente de

production des seconds messagers de la voie CD28. Toutefois, Masy *et al.* (1994) n'ont pas mis en évidence de relation directe entre l'engagement de la voie CD28/B7-BB1 et les variations inter-individuelles des réponses à la CsA.

#### *c. Les facteurs intracellulaires influençant la réponse*

La concentration ainsi que la compartimentation relative de la CyPA et de la CyPB dans la cellule peut influencer la sensibilité cellulaire vis à vis de la CsA. En effet, les cellules MRC5, lignée fibroblastique résistante à la CsA, présentent une concentration en CyPB supérieure à celle de la CyPA (Foxwell *et al.*, 1992), alors que les lymphocytes, cellules sensibles à la CsA, ont une concentration en CyPA supérieure à celle de la CyPB (Allain *et al.*, 1995). Ces résultats sont en accord avec le fait que la CyPA est le récepteur majoritaire de l'immunosuppression dans les lymphocytes.

De plus, 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 colocalisation avec la calcineurine dans le cytosol. La CyPB, en association avec la CAML, interviendrait dans la régulation du flux calcique lors de l'activation (Bram & Crabtree, 1994). La CsA bloquerait alors les voies de transduction  $Ca^{2+}$ -dépendantes, en particulier, celle impliquant la calcineurine. Par contre, la surexpression de la CyPC n'a aucun effet sur la sensibilité à la CsA. Cependant, la construction d'une CyPB chimérique flanquée des extrémités N- ou C-terminales de la CyPC abolit son activité dans l'immunosuppression. Ces résultats suggèrent que les peptides spécifiques de la CyPB interagissent directement dans les mécanismes sensibles à la CsA (Bram *et al.*, 1993).

La présence de la P-gp à la surface des lymphocytes T CD4, moins abondante que sur les lymphocytes T CD8, (Chaudhary *et al.*, 1992) peut également influencer la réponse à la CsA. Tout comme avec d'autres substances hydrophobes, la P-gp se comporte comme un transporteur de la CsA et exporte activement ce médicament. Des différences individuelles d'expression de la P-gp peuvent être responsable de phénomènes de résistance par épuration de la CsA hors de la cellule (Saeki *et al.*, 1993).

#### *d. Les facteurs extracellulaires influençant la réponse*

Dans le plasma, la CsA circulante est largement associée à des protéines plasmatiques, en particulier les lipoprotéines. De ce fait, des changements dans la concentration des lipoprotéines peuvent altérer la pharmacocinétique de la CsA, en affectant sa distribution dans le sang et son métabolisme dans le foie. Ainsi, la clairance et le volume de distribution de la

CsA diminuent lorsque la concentration en lipoprotéines augmente. Les lipoprotéines joueraient donc un rôle important dans la pharmacocinétique de la CsA par l'intermédiaire de leur récepteur membranaire (Lindholm, 1991a ; Barre, 1992).

D'autres protéines plasmatiques ont été identifiées comme jouant un rôle important dans l'activité anti-inflammatoire de la CsA :

- Dans la littérature, il a été montré l'existence de CyPs sécrétées (Ryffel *et al.*, 1991; Spik *et al.*, 1991 ; Davis *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995 ; Billich *et al.*, 1997). Certaines d'entre elles présentent des activités chimiotactiles et inflammatoires, activités inhibées en présence de CsA (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992).

- L'IL8 est une cytokine très importante dans les mécanismes inflammatoires. Elle induit le chimiotactisme, l'activation et la dégranulation des neutrophiles et des lymphocytes *in vitro*. *In vivo*, elle est responsable de l'accumulation massive de ces cellules sur les lieux de l'inflammation. Récemment, Bang *et al.* (1993) ont montré que l'IL8 et les CyPs présentent des épitopes similaires ou identiques, par réaction croisée avec un antisérum anti-IL8. Ces similitudes sont confirmées par l'analyse tridimensionnelle montrant de fortes homologies entre les CyPs et le dimère IL8. Outre cette homologie structurale et une activité chimioattractante commune, le dimère IL8 et les CyPs partagent la même capacité à fixer la CsA, mais avec une affinité moindre pour l'IL8. 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). Ainsi, ces CyPs extracellulaires à activité chimiotactique, tout comme l'IL8 pourraient être impliquées dans les mécanismes inflammatoires et par conséquent dans les mécanismes anti-inflammatoires de la CsA.

De part leur capacité à fixer la CsA, ces différentes protéines pourraient affecter la distribution de cette dernière et ainsi son activité immunosuppressive.

## ACTIVITES BIOLOGIQUES DES IMMUNOPHILINES

### I- ACTIVITE CHAPERONE, MISE EN CONFORMATION DE PROTEINES

La nature ubiquitaire et hautement conservée des CyPs et des FKBP s suggère un rôle fondamentale dans le métabolisme cellulaire. Le fait que ces protéines possèdent une activité enzymatique PPIase, amène à spéculer qu'elles joueraient un rôle dans le repliement de protéines intracellulaires.

#### A- Repliement de protéines *in vitro*

*In vitro*, il a été montré que la CyPA catalyse l'isomérisation des liaisons prolyls. En effet, l'activité PPIase de cette enzyme permet d'accélérer la renaturation de petites protéines, telles que la RNase A, préalablement dénaturées *in vitro*, en catalysant l'étape lente de repliement des liaisons Xaa-Pro (Fischer & Bang, 1985). De plus, cette activité ferait intervenir une spécificité de substrat, puisque la CyPA catalyse l'isomérisation de la liaison Phe22-Pro23 et non celle de la liaison Ala31-Pro32 dans la calcitonine (Kern *et al.*, 1993).

Une activité chaperone a également été suggérée pour la CyPA et le NK-TR. En effet, l'addition de ces PPIases influence le pourcentage de protéines correctement conformées après dénaturation, dans le cas du fragment Fab des immunoglobulines (Lilie *et al.*, 1993) ou de l'anhydrase carbonique II (Freskgard *et al.*, 1992 ; Rinfret *et al.*, 1994). La CsA inhibe cette activité ce qui suggère que le site catalytique est impliqué dans cette propriété (Freskgard *et al.*, 1992). Cependant des travaux récents montrent que les mécanismes enzymatiques impliqués dans la renaturation de l'anhydrase carbonique ne font intervenir que l'activité isomérase des CyPs, et non l'activité chaperone associée qui consisterait alors à protéger des conformères intermédiaires nécessaires au repliement progressif de la chaîne peptidique (Kern *et al.*, 1994).

L'intervention des FKBP dans la renaturation de protéines a beaucoup moins été étudiée que pour les CyPs (Lilie *et al.*, 1993 ; Kern *et al.*, 1993).

## B- Mise en conformation des protéines *in vivo*

### 1- Des preuves indirectes

Les premières expériences en faveur de l'intervention des CyPs dans la mise en conformation de protéines *in vivo* ont été des démonstrations indirectes. En effet, la CsA ralentit la mise en conformation du procollagène I, provoque des modifications post-translacionnelles et augmente sa dégradation intracellulaire, ce qui amène à une diminution de la production de collagène I et III par les fibroblastes humains (Steinmann *et al.*, 1991). De même, la CsA retarde la maturation de la transferrine dans le réticulum endoplasmique et sa sécrétion, à des concentrations en CsA qui n'affectent cependant pas celle d'autres protéines par les cellules de la lignée hépatocytaire HepG2. Ces résultats suggèrent que l'étape initiale du repliement de la transferrine est accélérée par une CyP puisqu'elle est inhibée par la CsA et non par le FK506, ni par la rapamycine (Lodish & Kong, 1991).

Ces travaux ont été confortés par ceux de Price *et al.* (1994) et de Smith *et al.* (1995). En effet, Smith *et al.* ont montré que la Hsp47 et la CyPB sont associées au procollagène dans le réticulum endoplasmique, suivent la voie de sécrétion et se dissocient progressivement en fonction de l'état de maturation du procollagène. Le traitement des cellules par la CsA diminue le taux de CyPB lié au procollagène, retarde la dissociation de l'Hsp47 du procollagène et la sécrétion de ce dernier, suggérant que la Hsp47 se libère du procollagène conformé en hélice. De même, Price *et al.* (1994) ont montré que les cellules HeLa et BHK sécrètent plus rapidement la CyPB quand elles sont traitées par la CsA. Ainsi, la CsA entrerait en compétition avec un ligand endogène de la CyPB tel que le procollagène. Ces résultats confirment l'hypothèse que la CyPB interviendrait dans des étapes de la voie de sécrétion en tant que chaperone pour des protéines destinées à la membrane ou à la sécrétion.

Des travaux réalisés chez *S. cerevisiae* sont également en faveur d'une activité chaperone associée aux CyPs. En effet, dans des conditions de stress, comme lors de chocs thermiques, il apparaît une augmentation de synthèse de la CYP1 cytoplasmique et de la CYP2 du réticulum endoplasmique. Cette production accrue facilite alors la survie cellulaire dans ces conditions de stress. Toutefois, les CyPs ne sont pas indispensables à la viabilité des organismes inférieurs, puisque l'extinction de leurs gènes ne nuit pas à la viabilité des cellules dans des conditions normales (Koser *et al.*, 1991 ; Tropschug *et al.*, 1989). Cette sensibilité au stress est semblable à celle observée pour les Hsp(s), ce qui peut s'expliquer par le fait que le promoteur du gène de la CYP1 possède une séquence consensus de réponse au stress, comme

chez les Hsp(s). De plus, les mutants négatifs des CYP1 et CYP2 sont sensibles aux chocs thermiques, ce qui démontre que ces protéines ont un rôle de Hsp chez la levure (Sykes *et al.*, 1993).

## 2- Rôle de Nina A dans la mise en conformation des rhodopsines

Un des meilleurs modèles permettant d'étudier les fonctions biologiques *in vivo* des CyPs est la protéine Nina A de la Drosophile.

Des mutations dans le gène *Nina A* de Drosophile causent des réductions dramatiques du taux de rhodopsines, menant à la perte de fonctions visuelles (Shieh *et al.*, 1989 ; Stamnes *et al.*, 1991 ; Ondek *et al.*, 1992). Dans les cellules photoréceptrices de la Drosophile de type sauvage, le pigment visuel majeur rhodopsine 1 (Rh1) est synthétisé dans le réticulum endoplasmique et est transporté via la voie de sécrétion vers les rhobdomères (organelles sensibles à la lumière) où il intervient dans la transduction du signal. En absence de Nina A, Rh1 s'accumule dans le réticulum endoplasmique et n'est plus transporté vers les rhobdomères (Colley *et al.*, 1991 ; Baker *et al.*, 1994). La Rh1 mal conformée pourrait être dégradée dans le réticulum endoplasmique, conduisant à une diminution du taux de rhodopsine, caractéristique des mutants *Nina A*.

Nina A présente une spécificité de substrat vis à vis des rhodopsines. Elle se fixe spécifiquement aux Rh1 et Rh2 (Stamnes *et al.*, 1991). Nina A et Rh1 sont colocalisés dans les vésicules de transport des cellules photoréceptrices (Colley *et al.*, 1991). De plus, NinaA et Rh1 forment *in vivo* un complexe spécifique et stable, nécessaire à la maturation de Rh1 vers les rhobdomères (Baker *et al.*, 1994). Ainsi, Nina A agit comme une protéine chaperone escortant Rh1 à travers la voie de sécrétion.

Stamnes *et al.* (1991) ont montré que la rétine de vertébrés contient également une protéine de 30 kDa semblable à Nina A. De plus, il existe chez l'Homme une maladie héréditaire de la pigmentation de la rétine (*Retinis Pigmentosa*) provoquant une dégénérescence de la rétine et menant à une éventuelle cécité. Cette maladie serait due à des mutations dominantes dans le gène codant pour le pigment visuel rhodopsine, menant à une mauvaise conformation. Ainsi, le processus de maturation faisant intervenir un complexe protéique (Baker *et al.*, 1994) est bloqué et la protéine s'accumule dans le réticulum endoplasmique (Colley *et al.*, 1995).

## II- INTERACTION DES IMMUNOPHILINES AVEC DES PROTEINES CIBLES

### A- Protéines associées au $\text{Ca}^{2+}$

#### 1- Interactions de la FKBP12 avec les canaux calciques intracellulaires

Les canaux calciques intracellulaires ou CRC ( $\text{Ca}^{2+}$  released channel) sont une classe de canaux caractérisés par leur grande masse moléculaire et une organisation symétrique. Il en existe deux types, les récepteurs à Ryanodine (RyRs) et les récepteurs à  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) (Marks, 1996).

Les RyR sont organisés en tétramères, composés de 4 protomères de 565 kDa, la structure entière faisant  $2,3 \cdot 10^6$  kDa. On distingue deux isoformes de RyR : l'isoforme 1, RyR<sub>1</sub>, isolée de la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique et l'isoforme 2, RyR<sub>2</sub>, isolée du réticulum sarcoplasmique du muscle cardiaque (Lam *et al.*, 1995). Ces deux isoformes sont impliquées dans la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  lors du couplage excitation/contraction (Fleischer & Inui, 1989).

L' $\text{IP}_3\text{R}$  présente des homologies de séquence et des similitudes fonctionnelles avec les RyRs (Mignery *et al.*, 1989). Il existe 3 types d' $\text{IP}_3\text{-R}$ . Le type 1 a été cloné à partir de tissus humains (Harnick *et al.*, 1995). Réciproquement, le type 2 et 3 partagent 69 et 64% d'homologie avec le type 1 (Yamamoto-Hino *et al.*, 1994). Les  $\text{IP}_3\text{-R}$  sont formés de 3 domaines : un domaine de fixation du ligand dans l'extrémité N-terminale, un domaine couplé entre la liaison de l' $\text{IP}_3$  et l'activation du CRC et une région C-terminale formant le canal (Mignery *et al.*, 1989).

Récemment des auteurs ont montré que ces 2 types de CRC étaient physiologiquement associés avec la FKBP12 (Jayamaran *et al.*, 1992 ; Cameron *et al.*, 1995a).

Des études stoechiométriques ont montré qu'une molécule de FKBP12 est associée à chaque molécule de RyR, soit 4 molécules de FKBP12 par tétramère (Timerman *et al.*, 1993). Selon Brillantes *et al.* (1994), la FKBP12 augmente la coopérativité entre les 4 sous-unités du RyR, rendant l'ouverture des canaux plus difficile et diminuant ainsi le temps d'ouverture. Le FK506 et la rapamycine bloque cet effet stabilisant de la FKBP12. Les canaux sont alors activés et libèrent le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Cependant, les mutants FKBP12 dépourvus d'activité PPIase ne perturbent pas l'activité des CRCs ce qui suggère que cet effet stabilisant est indépendant de l'activité enzymatique (Timerman *et al.*, 1995). La fixation de la FKBP12

sur le RyR est réversible, dépendante de la température et présente un  $K_d$  de 0,3  $\mu\text{M}$ , soit 10 fois supérieur à la concentration cytoplasmique de la FKBP12. Ainsi, dans les conditions de température corporelle et de concentration myoplasmique en FKBP12, l'échange entre la FKBP12 et le RyR devrait être rapide.

La cellule doit donc posséder un mécanisme de régulation afin de moduler la sensibilité des CRCs au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, l' $\text{IP}_3\text{R}$  possède 3 sites de phosphorylation pour la PKC, la protéine kinase II dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et de la calmoduline (CaMKII) et la kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Ferris *et al.*, 1991). La phosphorylation/déphosphorylation pourrait réguler la fonction de l' $\text{IP}_3\text{R}$ . En effet, la phosphorylation par la PKC et la CaMKII augmente l'effet de l' $\text{IP}_3$  dans la stimulation du flux calcique, alors que la phosphorylation par la PKA diminue cet effet. De plus, la calcineurine serait physiologiquement associée aux complexes  $\text{IP}_3\text{R}$ -FKBP12 et RyR-FKBP12 et cette interaction  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante est perturbée en présence de FK506 et de rapamycine et non de CsA. Le fait que la calcineurine interagisse physiologiquement avec la FKBP12, via ces complexes, suggère que les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  et les RyRs possèdent, dans des régions communes, des domaines "FK506-like". Ainsi, l'intervention de la FKBP12 dans les complexes calcineurine/ $\text{IP}_3\text{R}$  ou RyR serait de faciliter le cycle phosphorylation/déphosphorylation du récepteur qui à son tour modulerait la conductance pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette interaction participerait à la génération de flux calciques, conduisant à des réponses physiologiques comme le couplage excitation/contraction ou l'activation des lymphocytes T (Cameron *et al.*, 1995b).

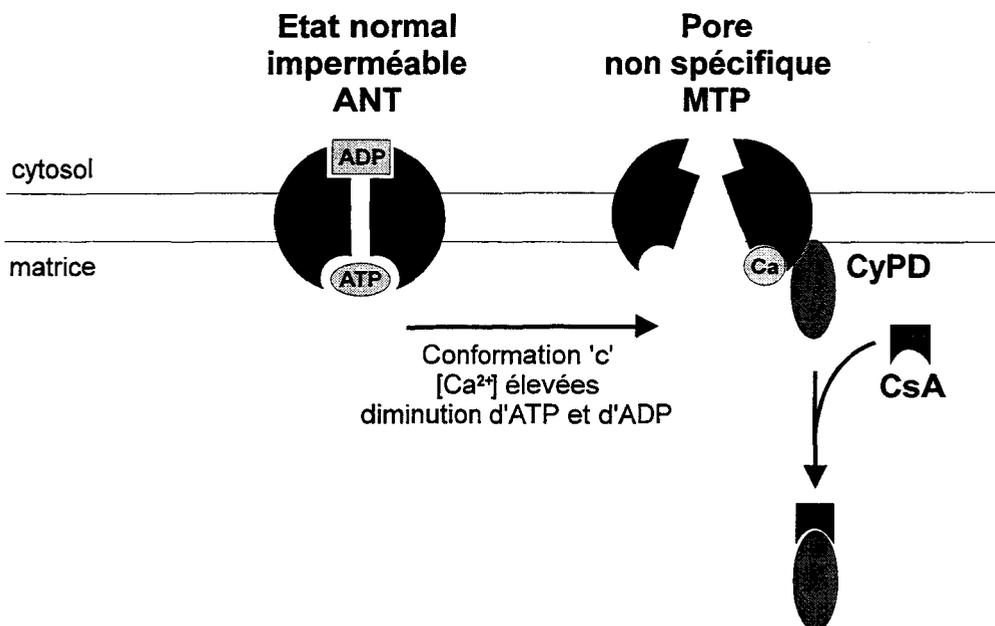
## 2- Interaction de la CyPD avec le canal $\text{ADP}/\text{Ca}^{2+}$ mitochondrial

Quand la mitochondrie est exposée à des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  supraphysiologiques, elle devient perméable, de manière non spécifique, aux petites molécules (<1500 Da) par l'ouverture d'un pore non-spécifique. Ce phénomène, appelé MPT (Mitochondrial permeability transition), entraîne un gonflement de la mitochondrie provoquant des dommages conséquents. Ces dommages peuvent être provoqués lors de perfusions suite à une période d'ischémie qui peut avoir lieu après une chirurgie cardiaque ou une transplantation d'organe (Griffiths & Halestrap, 1995 ; Halestrap *et al.*, 1996).

La MPT a été décrit comme un événement préapoptotic (Kroemer *et al.*, 1997). La sensibilité de la MPT au  $\text{Ca}^{2+}$  est augmentée dans des conditions de stress oxydatif, par la réduction de nucléotides adénine (ATP et ADP), par une augmentation de la concentration en phosphate, un faible potentiel membranaire et par des agents chimiques qui stabilisent la

conformation "c" de l'Adenine Nucléotide Translocase (ANT). Au contraire, la MPT est évitée par des pH acides, un potentiel membranaire élevé et des agents chimiques qui stabilisent la conformation "m" de l'ANT (Crompton & Costi, 1988 ; Lequoc & Lequoc 1988). Ces arguments sont en accord avec le fait que la MPT est associée à l'ANT.

Le fait que la CsA inhibe l'ouverture de ce pore non-spécifique (Crompton *et al.*, 1988) suggère qu'une protéine de la famille des CyPs est impliquée dans cette ouverture (Halestrap & Davidson, 1990). En effet, les constantes d'inhibition de différents analogues de la CsA vis à vis d'une PPIase de la matrice mitochondriale corrént avec leur profil d'inhibition de l'ouverture du pore non-spécifique (Griffiths & Halestrap, 1991 ; Nicolli *et al.*, 1996). De plus, l'induction d'un stress oxydatif conduisant à l'ouverture du pore, provoque la fixation d'une CyP à la membrane interne de la mitochondrie (Connern & Halestrap, 1994). En utilisant un dérivé photomarqué de la CsA, Tanveer *et al.* (1996) ont montré que la CyP associée à ce pore était la CyPD (Figure 11).



**Figure 11 : Schéma illustrant le mécanisme proposé de l'ouverture du pore non-spécifique de la mitochondrie (Griffiths & Halestrap, 1991).**

Ainsi, la CyPD se fixerait à l'ANT en conformation "c" par son site enzymatique au niveau du résidu Pro61 exposée en surface du côté de la matrice mitochondriale. Quand l'ANT est en conformation "m", la Pro61 n'est pas accessible à la CyPD. En présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et sans ADP lié à l'ANT, la CyPD se lie à la Pro61 et cause un changement de conformation alors suffisant pour former le pore non-spécifique MPT (Griffiths & Halestrap, 1991).

En inhibant la MPT via l'activation de la cyclophiline mitochondriale, la CsA peut alors inhiber le phénomène d'apoptose (Kroemer *et al.*, 1997).

## **B- Protéines impliquées dans l'activation des lymphocytes**

### 1- Interaction avec la calcineurine

La CsA et le FK506 forment des complexes avec la CyPA et la FKBP12 qui inhibent la calcineurine bloquant ainsi des événements du signal de transduction nécessaires à l'activation des lymphocytes T. *In vitro*, ni les immunosuppresseurs, ni les immunophilines seuls ne se lient et n'inhibent la calcineurine (Liu *et al.*, 1991).

Cependant, Cardenas *et al.* (1994) ont montré par la méthode du double hybride et par chromatographie d'affinité, que la FKBP12 et la CyPA peuvent interagir directement avec la calcineurine en absence de leurs ligands exogènes immunosuppresseurs. En présence de FK506 et de CsA, cette interaction serait alors renforcée.

Par des expériences *in vitro* d'inhibition de l'activité de la calcineurine et par une approche génétique, ils ont également montré que la FKBP12 non complexée inhibe légèrement cette activité alors que la CyPA n'a aucun effet. Ces résultats suggèrent que ces deux immunophilines modulent réciproquement l'activité de la calcineurine.

Les complexes FKBP12/calcineurine et FKBP12/FK506/calcineurine sont différents. En effet :

- Les acides aminés de la FKBP12 impliqués dans l'interaction dépendante du FK506 avec la calcineurine ne sont pas nécessaires à l'interaction directe de la FKBP12 avec la calcineurine.

- La rapamycine interfère avec la formation du complexe FKBP12/FK506/calcineurine mais pas dans le cas du complexe FKBP12/calcineurine.

- Les complexes CyPA/CsA et FKBP12/FK506 sont en compétition pour la liaison à la calcineurine, mais ils n'interfèrent pas avec la fixation de la FKBP12 seule.

- La sous-unité régulatrice B (CnB) nécessaire à la formation du complexe dépendant du FK506, n'est pas requise dans le cas du complexe FKBP12/calcineurine. Au contraire, cette interaction est augmentée en absence de CnB. De plus, la sous-unité A (CnA) interagissant avec la FKBP12 contient le site de fixation de la CnB, ce qui suggère que la FKBP12 et la CnB sont en compétition pour la liaison à la CnA.

Les complexes FKBP12/FK506/calcineurine et FKBP12/calcineurine sont structuralement distincts, la FKBP12 et le complexe FKBP12/FK506 emploient des surfaces différentes pour interagir avec la calcineurine.

Cette interaction indépendante des immunosuppresseurs ne fait pas intervenir l'activité PPIase des immunophilines. Toutefois, elle est spécifique de la FKBP12 et de la CyPA ce qui suggère que des surfaces autres que le site actif doivent intervenir dans cette interaction. Ainsi, la poche fixant les immunosuppresseurs reste accessible dans les complexes immunophiline/calcineurine. La liaison du FK506 ou de la CsA sur ces complexes pré-existants renforce l'interaction et provoque un changement de structure du complexe inhibant l'activité phosphatase de la calcineurine.

Cardenas *et al.* (1994) ont proposé deux modèles expliquant les rôles de la FKBP12 et de la CyPA dans la modulation de l'activité de la calcineurine. Dans le premier modèle, la FKBP12 et la CyPA réguleraient l'assemblage dynamique de la calcineurine : la FKBP12 inhibe l'association de la CnB avec la CnA alors que la CyPA facilite cette interaction. Dans le second modèle, les deux immunophilines réguleraient l'activité de la calcineurine en agissant au niveau des changements de conformation induits par la fixation et la libération de la calmoduline de la CnA. Elles participeraient alors directement à la transduction du signal.

## 2- Interaction avec la CAML

Par la méthode du double hybride chez la levure, Bram & Crabtree (1994) ont caractérisé au moins dix récepteurs potentiels de la CyPB. La surexpression d'une des protéines caractérisées induit la transcription du gène d'IL2 dans les cellules Jurkat, par activation des facteurs de transcription NF-AT et NF-IL2A. Cette protéine, nommée CAML, intervient dans la voie de transduction du signal menant à la transcription du gène de l'IL2. Elle se situe 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  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendants.

La CAML est une protéine de 296 acides aminés, avec une masse moléculaire prédite de 33 kDa mais de 44 kDa après glycosylation. Elle est spécifique de la CyPB, et n'interagit ni avec les CyPA ou CyPC, ni avec la FKBP12 ou la calcineurine. Elle est présente dans tous les tissus testés. Par microscopie de fluorescence, la CAML apparaît dans des structures membranaires intracellulaires similaires aux calciosomes décrits par Arber *et al.* (1992) pour la CyPB. La CAML est une protéine transmembranaire 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 (Bram & Crabtree, 1994). Par construction de différents mutants de la CAML, Holloway & Bram (1996) ont démontré que les résidus 240-289 de la CAML sont nécessaires et suffisants pour activer le flux calcique quand ils sont surexprimés dans les cellules T Jurkat. Ces résidus recouvrent les domaines transmembranaires 2 et 3. Parce que le domaine cytosolique N-terminal de la protéine n'active pas de flux calcique et n'est pas nécessaire à l'activité du fragment 240-289, il pourrait cependant réguler la fonction de la CAML dans des conditions normales, sans exclure un rôle possible de régulation par d'autres facteurs.

La cible en aval de la CAML n'est actuellement pas encore connue mais elle pourrait être composée d'une pompe à  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique ou d'un canal intracellulaire à  $\text{Ca}^{2+}$ , comme le récepteur à  $\text{IP}_3$ .

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

### **C- Interaction de la CyPC avec la CyCAP**

Sur colonne d'affinité CyPC-glutathione-S-transférase (CyPC-GST), plusieurs protéines présentant une affinité pour la CyPC ont été mises en évidence à partir d'un lysat cellulaire de la lignée lymphoblastique murine AC-6. On observe ainsi une forte affinité pour les protéines de masse moléculaire 77 kDa, 60 kDa, 37 kDa et 25 kDa, ces interactions sont bloquées en présence de CsA et sont spécifiques de la CyPC puisque non observées dans le cas de la CyPA et la CyPB (Friedman *et al.*, 1993). En 1991, Friedman & Weissman avaient déjà mis en

évidence une protéine de 77 kDa affine pour la CyPC à partir de lysat cellulaire de la lignée AC-6 et de la lignée humaine Jurkat. Le fait que la CsA inhibe ces interactions suggère que le site catalytique de la CyPC est impliqué dans les interactions avec ces protéines (Friedman & Weissman, 1991).

L'analyse de la séquence des fragments tryptiques issus des protéines de 77 kDa, 60 kDa et de 37 kDa montre de fortes homologues entre ces trois protéines et ces peptides n'ont permis d'isoler qu'un seul clone par criblage d'une banque d'ADNc. Cet ADNc correspond à une protéine, nommée CyCAP (CyPC-associated protein), de 574 acides aminés avec une masse moléculaire de 64 kDa. Des études de transfection de cet ADNc dans des cellules COS révèlent que le produit qui en résulte est une glycoprotéine de masse moléculaire 77 kDa en accord avec les résultats précédents. En effet, la CyCAP possède cinq sites potentiels de N-glycosylation et le traitement par une glycosidase conduit à l'obtention d'une protéine de 64 kDa conforme à la masse prédite à partir de l'ADNc. La CyCAP possède également une séquence N-terminale lui conférant la possibilité d'être sécrétée ainsi qu'un domaine riche en cystéine, appelé domaine SRCR ("scavenger receptor cysteine-rich") commun à d'autres protéines membranaires et sécrétées (Friedman *et al.*, 1993). La CyCAP appartient donc à une famille de protéines transmembranaires et sécrétées contenant le domaine SRCR.

#### **D- Interaction de la FKBP12 avec le récepteur du TGF $\beta$**

Les membres de la famille du TGF $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) se lient à des récepteurs constitués de sous-unités hétéromériques (type I et type II) à activité sérine-thréonine kinase.

Par la méthode du double hybride dans la levure, Wang *et al.* (1994) ont montré que la FKBP12 interagit avec le récepteur de type I du TGF $\beta$ . Par des expériences de délétion, de mutation et par immunoprécipitation, ils ont montré que cette interaction est spécifique. En présence de FK506 (1 $\mu$ M), cette interaction est inhibée, ce qui suggère que le R<sub>I</sub>-TGF $\beta$  et le FK506 partagent ou recouvrent un même site de liaison sur la FKBP12. Ainsi, la FKBP12 pourrait jouer un rôle dans la transduction du signal induit par le TGF $\beta$  (Wang *et al.*, 1994).

#### **E- Interaction avec le récepteur des hormones stéroïdes**

En absence d'hormone, les récepteurs des hormones stéroïdes sont inclus dans des complexes macromoléculaires retrouvés dans le cytosol. Cette forme de récepteur ne lie pas

l'ADN. La liaison du stéroïde au récepteur entraîne un changement de structure du récepteur, avec dissociation des protéines associées. Le récepteur est alors capable de se lier à l'ADN et d'induire l'activation de l'expression d'un gène cible.

Au moins six protéines sont identifiées comme étant des partenaires des récepteurs à stéroïdes sous leur forme non active, non transformée :

- Hsp90 (Renoir *et al.*, 1984)
- Hsp70 (Kost *et al.*, 1989 ; Sanchez *et al.*, 1990)
- FKBP59 ou encore FKBP52 (Renoir *et al.*, 1994 ; 1995 ; Peattie *et al.*, 1992)
- FKBP50 et FKBP54 (Smith *et al.*, 1993)
- CyP40 (Ratajczak *et al.*, 1993)
- P23 (Smith *et al.*, 1990 ; Sanchez *et al.*, 1990) ; P60 (Smith *et al.*, 1993) ; P48 (Smith *et al.*, 1993)

Ces protéines ainsi associées favoriseraient une structure tridimensionnelle du récepteur compatible à sa fonction, maintiendraient la structure hétéro-oligomérique et dirigeraient les récepteurs à travers les compartiments cellulaires.

La Hsp90 se lie aux récepteurs dans le site de liaison de l'hormone (Smith *et al.*, 1990). Ainsi, la liaison de l'hormone à leurs récepteurs entraîne la dissociation de la Hsp90. Après activation hormonale, la réassociation du récepteur avec la Hsp90 est une étape obligatoire pour que le récepteur puisse à nouveau être actif (Yan & De Franco, 1996).

La FKBP52 et la CyP40 ont en commun des motifs TPR nécessaires à leur fixation à la Hsp90 (Ratajczak *et al.*, 1993 ; Radanyl *et al.*, 1994). Ces deux protéines rentrent en compétition pour leur fixation sur le même site sur la Hsp90 (Owens-Grillo *et al.*, 1995 ; Hoffman et Handshumacher, 1995 ; Ratajczak & Carrello, 1996 ; Owens-Grillo *et al.*, 1996).

Les immunosuppresseurs comme la CsA, le FK506 et la Rapamycine ne modifient pas la structure hétéro-oligomérique du récepteur. Ils n'altèrent pas la composition des protéines associées aux récepteurs mais augmentent l'affinité des récepteurs pour leur ligand stéroïdien (Renoir *et al.*, 1994), ce qui conduit à une augmentation de l'expression du gène cible (Renoir *et al.*, 1995).

Les fonctions de la FKBP52 et la CyP40 dans l'action des récepteurs des stéroïdes restent encore indéfinies. En effet, elles ne sont pas nécessaires à l'assemblage de l'hétérocomplexe, ni au repliement du domaine de liaison de l'hormone en une conformation plus affine pour l'hormone. Cependant, puisque la FKBP52 et la CyP40 ont une localisation cellulaire commune avec les récepteurs à stéroïdes (Gasc *et al.*, 1990 ; Czar *et al.*, 1994), elles

joueraient un rôle dans le trafic cellulaire de ces récepteurs, rôle indépendant de leur activité enzymatique PPIase. Ainsi, la FKBP52 et la CyP40 interviendraient successivement dans la circulation du récepteur dans la cellule : soit du cytosol vers le noyau, soit du noyau vers le cytosol (Czar *et al.*, 1995).

### III- PROPRIETES PARTICULIERES

#### A- Activité chimiotactile

Lors de la purification de facteurs chimioattractants pour les éosinophiles synthétisés par l'utérus de Rat sous stimulation aux oestrogènes, Xu *et al.* (1992) ont isolé une protéine de 18 kDa présentant une séquence N-terminale identique à la CyPA de Rat. Cette p18, ainsi que la CyPA isolée de thymocytes de boeuf et la CyPA recombinante, montrent la même activité chimiotactile *in vitro* pour les éosinophiles et les neutrophiles avec une activité maximale à 10 nM. Elles provoquent la dégranulation des éosinophiles avec libération de l'activité peroxydase. Ces deux activités sont inhibées par l'addition de CsA et non par l'analogue non immunosuppresseur (1-furfuryl CsA).

Des travaux similaires montrent qu'une sp18 sécrétée par les macrophages de souris stimulés par les LPS possède *in vivo* une activité inflammatoire et *in vitro* une activité chimiotactile pour les monocytes et les neutrophiles avec une activité maximale à 25 nM. De même, cette activité est inhibée en présence de CsA et non par la CsH, analogue structurale de la CsA qui ne se lie pas aux CyPs (Sherry *et al.*, 1992).

Afin de déterminer si l'activité chimiotactile des cyclophilines est une propriété commune à toutes les immunophilines, Leiva & Lyttle (1992) ont testé les FKBP. Ainsi, ils ont montré que la FKBP présente une activité chimiotactile pour les neutrophiles avec une activité maximale entre  $10^{-10}$  et  $10^{-12}$  M. Cette activité est inhibée en présence de FK506 et non par la rapamycine. De même que l'activité décrite pour les cyclophilines est inhibée par la CsA et non par son analogue Me<sup>6</sup>Ala-CsA se fixant aux CyPs.

En 1995, Bang *et al.* ont montré que les mastocytes stimulés par des anticorps anti-IgE libèrent la FKBP12. Cette FKBP12 sécrétée active les neutrophiles et induit un signal calcique intracellulaire dépendant du récepteur à Ryanodine. Ce signal est inhibé en présence de FK506 et de rapamycine. Ces travaux sont en accord avec ceux de Leiva & Lyttle (1992) qui ont montrés que la FKBP12 sécrétée possède une activité chimioattractante vis à vis des neutrophiles.

## B- Activité mitogène

Des formes sécrétées de la CyPB ont été mises en évidence dans de nombreux travaux. Certaines de ces isoformes sécrétées possèdent une activité mitogène. Selon Caroni *et al.* (1991), la CyPB d'embryon de poulet a une activité de croissance pour les cellules embryonnaires de la moelle épinière et une activité mitogène vis à vis des fibroblastes et des cellules de coeur de poulet. Toutefois, la concentration en CyPB utilisée est nettement supérieure à celles d'autres facteurs de croissance (500 nM).

Des premiers travaux suggéraient que la CyPB isolée du lait de Femme possédait également une activité mitogène pour les fibroblastes de la lignée CCL-29. Cette activité n'a pas été retrouvée depuis avec la CyPB recombinante. Il semblerait donc que cette activité soit due à la présence d'un contaminant mitogène du lait (Spik *et al.*, 1991).

## C- Activité nucléaire

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, a lieu dans de nombreuses situations physiologiques par destruction sélective de cellules. L'une des étapes du processus d'apoptose dans les lymphocytes est la dégradation de l'ADN internucléosomal par une nucléase.

La Nuc18, protéine nucléaire de 18 kDa, a été caractérisée comme étant une nucléase dont l'activité est associée à la dégradation de l'ADN de thymocytes de Rat lors de l'apoptose induite par un traitement aux glucocorticoïdes. L'activité de la Nuc18 est dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$ , mais inhibée par les ions  $\text{Zn}^{2+}$  (Gaido & Cidlowski, 1991).

Montague *et al.* ont montré en 1994, que la Nuc18 possède des similitudes de séquence et de structure avec les protéines de la famille des cyclophilines. De plus, les CyPs recombinantes A, B et C présentent *in vitro* une activité nucléasique  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dépendante, identique à celle de Nuc18. Cette activité nucléasique est stimulée en présence de CsA (Montague *et al.*, 1994). Ces CyPs peuvent dégrader à la fois l'ADN simple brin et double brin et produisent des fragments 3'OH-terminaux, identiques à ceux observés dans des cellules apoptotiques. Elles présentent également une activité endonucléasique démontrant leur capacité à dégrader l'ADN supercolloïdale. Ces résultats suggèrent que les CyPs sont impliquées dans la dégradation du génome durant l'apoptose (Montague & Cidlowski, 1996 ; Montague *et al.*, 1997).

L'activité nucléasique de la CyPA (Montague *et al.*, 1994) est en accord avec sa localisation nucléaire (Ryffel *et al.*, 1991 ; Krummrei *et al.*, 1995). En effet, par immunofluorescence, Krummrei *et al.* (1995) ont montré que la CyPA était présente dans le cytoplasme et le noyau, contrairement à la CyPB. Cette isoforme nucléaire de la CyPA se lie à l'ADN de façon dépendante du  $Zn^{2+}$ . Cependant en présence de  $Zn^{2+}$ , l'activité PPIase de la CyPA est inhibée ainsi que la capacité à fixer la CsA. Dans des conditions de croissance normale, la CyPA nucléaire se lie à l'ADN en présence de  $Zn^{2+}$ , tandis que durant le processus d'apoptose, la CyPA perd sa capacité à fixer le  $Zn^{2+}$ , ce qui induirait alors son activité nucléasique.

Récemment, une nouvelle CyP nucléaire a été clonée à partir de cellules T Jurkat (Mi *et al.*, 1996). Cette protéine de 33 kDa possède une activité PPIase identique à la CyPA, elle est inhibée par la CsA. La CyP33 se lie à l'ARN. Elle présente des préférences de liaison pour les résidus adénine et uridine. Mais son rôle dans la fixation avec l'ARN n'a pas encore été démontré.

Outre ces isoformes de CyPs, il a également été montré une localisation nucléaire pour les FKBP. La FKBP25 est également une protéine qui se lie à l'ADN (Rivière *et al.*, 1993). Jin & Burakoff (1993) ont également montré que la FKBP25 s'associe à la caséine kinase II, protéine kinase présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme, et à la nucléoline dans des extraits nucléaires de cellules T de Souris.

## **D- Interaction de la CyPA et de la CyPB avec la Protéine Gag de HIV-1**

Le gène *gag* du virus de l'immunodéficience humaine de type I (HIV-1) et d'autres rétrovirus code pour une polyprotéine (p55) possédant de nombreuses fonctions dans l'assemblage des virions et l'infection dans la cellule hôte. Cette polyprotéine est constituée de la matrice (p17), de la capsid (p24) et de la nucléocapsid (p7/6) (Jones & Start, 1996).

Les fonctions assurées par Gag dans le cycle du rétrovirus nécessitent également des protéines de la cellule hôte. Par la méthode de double hybride chez la levure, Luban *et al.* (1993) ont montré une interaction entre la protéine Gag de HIV-1 et les CyPA et CyPB. De même *in vitro*, les protéines de fusion glutathion-S-transférase/CyPA, B et C se lient fortement à la protéine Gag p55 et à la protéine de la capsid p24 (Luban *et al.*, 1993 ; Franke *et al.*, 1994). Toutefois, les polyprotéines codées par d'autres rétrovirus comme le virus HIV-

2, le SIV (simien), le MoMLV (murin) n'interagissent pas avec la CyPA (Luban *et al.*, 1993 ; Thali *et al.*, 1994), alors que la Gag du SIV interagit avec la CyPB.

La CyPA est spécifiquement incorporée dans les virions HIV-1 et non dans les autres virions immunodéficients de primates. Cette incorporation est corrélée avec la capacité de la polyprotéine Gag à fixer la CyPA. La CsA, comme son analogue non immunosuppresseur MeIle4-CsA, bloque l'interaction Gag-CyPA *in vitro* et empêche l'incorporation de la CyPA dans le virion (Franke *et al.*, 1994). De plus, la CsA inhibe la réplication du virus (Rosenwirth *et al.*, 1994 ; Thali *et al.*, 1994). Les doses de CsA nécessaires pour inhiber la réplication du virus HIV-1 sont 10 à 100 fois plus élevées que celles nécessaires à l'immunosuppression, mais correspondent à la concentration en CyPA normalement trouvée dans le cytoplasme (Koletsky *et al.*, 1986 ; Harding *et al.*, 1986). Ceci suggère que la CsA inhibe la réplication par compétition avec la protéine Gag pour la fixation avec la CyPA.

Le site d'interaction de la protéine Gag de HIV-1 avec la CyPA est localisée dans le domaine de la capsid. Par construction de Gag chimère HIV-1/SIV, Franke *et al.* (1994) ont limité ce site à la séquence riche en proline (PX<sub>4</sub>PX<sub>2</sub>PX<sub>5</sub>P). Cette séquence est conservée dans tous les HIV-1 isolés mais n'est pas conservée chez les autres virus immunodéficients de primates. Le résidu Pro222 est indispensable à la fixation de la CyPA (Franke *et al.*, 1994 ; Colgan *et al.*, 1996). De plus, une molécule de CyPA interagit avec dix molécules de Gag p55 (Thali *et al.*, 1994), ce qui suggère que Gag interagit avec la CyPA, sous une forme multimérique (Colgan *et al.*, 1996).

La CyPA est nécessaire à la réplication du virus HIV-1. Elle intervient dans une étape précoce du cycle du rétrovirus, c'est à dire après la fixation du virus au récepteur CD4 et sa fusion avec la membrane, mais avant la transcription reverse. Elle n'intervient pas dans l'assemblage du virion, ni dans l'emballage des protéines et de l'ARN génomique viral mais serait nécessaire à la synthèse de l'ADN viral dans les cellules T infectées (Braaten *et al.*, 1996b).

Ainsi, la CyPA est la première protéine cellulaire, autre que le récepteur CD4 à la surface des cellules T, décrite comme étant nécessaire à l'infection d'une nouvelle cellule hôte par le virus HIV-1.

## CONCLUSION

En dehors de leur utilisation à des fins thérapeutiques, les immunosuppresseurs se sont révélés de précieux outils en recherche fondamentale pour étudier certains mécanismes impliqués dans l'activation et la prolifération du lymphocyte T. En effet, la CsA et le FK506 ont permis de caractériser la calcineurine comme étant l'enzyme clé de l'activation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante du lymphocyte T et de confirmer l'importance du facteur de transcription essentiel à la synthèse de l'IL2, le NF-AT. La rapamycine a permis de mettre en évidence une phosphatidylinositol-4-kinase (mTOR), élément intermédiaire dans la cascade aboutissant à l'activation de la p70 S6 kinase et à la prolifération.

Une fois complexée à leur immunophiline respective, les immunosuppresseurs inhibent ces différentes voies d'activation, permettant ainsi à leurs propriétés immunosuppressives de s'exercer. Ainsi, l'action de la CsA nécessite la formation d'un complexe avec la CyPA, candidate idéale de part son abondance et sa localisation cytosolique avec la calcineurine. Toutefois, les autres isoformes des CyPs pourraient intervenir dans les mécanismes de sensibilité lymphocytaire et de toxicité. La localisation restreinte de la CyPC chez la souris avait suggéré un rôle possible dans la néphrotoxicité, mais sa caractérisation 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, des cellules présentant un taux en CyPB supérieur à celui de la CyPA s'avèrent être résistantes à la CsA, sans doute par une séquestration du médicament dans des compartiments subcellulaires empêchant toute interaction avec la CyPA et la calcineurine. Paradoxalement, la surexpression de la CyPB augmente la sensibilité des lymphocytes pour la CsA. Entre temps, la mise en évidence de la CAML a permis d'établir une relation entre la CyPB et l'activation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante des lymphocytes. De plus, la caractérisation de la CyPB dans le plasma place la CyPB comme candidat potentiel intervenant dans les mécanismes de sensibilité à l'action de la CsA. En effet, l'existence d'un complexe CyPB/CsA extracellulaire pourrait modifier la disponibilité du médicament et permettre un ciblage vers des cellules exprimant un récepteur spécifique.

Outre leurs rôles primordiaux dans l'activité des immunosuppresseurs, peu de données sont connues sur les fonctions biologiques des immunophilines. Ces protéines possèdent toutes une activité peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase, ce qui a permis de leur associer un rôle important dans les étapes de renaturation des protéines *in vitro*. Cependant, l'implication de

cette activité enzymatique dans des processus biologiques n'est toujours pas clairement démontrée. Par contre, de nombreux travaux ont permis d'associer des propriétés spécifiques à certaines isoformes des immunophilines. Ainsi, la FKBP12 stabilise le RyR et l'IP<sub>3</sub>-R. La CyPD intervient dans l'ouverture d'un pore de la membrane mitochondriale. La CyPB interagit avec la CAML, protéine impliquée dans la régulation des flux calciques intracellulaires. De plus, cette isoforme est retrouvée sécrétée dans le plasma et se fixe spécifiquement à la surface des lymphocytes T.

Afin d'élucider les rôles potentiels de la CyPB plasmatique, nous avons étudié les interactions de cette protéine avec les lymphocytes circulants. En particulier, nous nous sommes intéressée à la distribution des sites de fixation, à leur nature ainsi qu'à leurs principales propriétés. Ces travaux ont été étendus aux interactions spécifiques du complexe CyPB/CsA et à ses propriétés immunosuppressives, afin de mieux comprendre le rôle de la CyPB et de ses récepteurs en tant que médiateurs de l'incorporation du médicament dans les lymphocytes T.

# *Travaux personnels*

---

## INTRODUCTION

La CyPB a été décrite comme étant une protéine résidente du réticulum endoplasmique. Cependant, il a été montré au laboratoire qu'il existe également une forme sécrétée retrouvée dans les liquides biologiques, tels que le lait et le plasma humain (Spik *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995). Sa présence dans le plasma suggère que la CyPB peut interagir avec des sites de fixation sur des cellules circulantes, notamment les lymphocytes.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié, dans un premier temps, la fixation de la CyPB à la surface de cellules lymphoblastiques. Nous avons ainsi caractérisé la présence de sites de fixation membranaires à la surface des cellules T Jurkat et montré que la CyPB est partiellement endocytée dans ces cellules. De plus, les interactions de la CyPB avec ses sites de fixation impliquent la reconnaissance de son extrémité spécifique N-terminale. Sur la base de ces résultats préliminaires, nous avons étudié la fixation membranaire de cette protéine sur les lymphocytes circulants. Par cytofluorimétrie en flux, nous avons analysé le phénotype des cellules interagissant avec la CyPB, et nous avons ensuite déterminé les paramètres de fixation sur les lymphocytes T quiescents et activés.

Toutefois, la faible inhibition de fixation par le peptide N-terminal et l'endocytose partielle de la CyPB, ont soulevé l'hypothèse de l'existence de deux régions de la CyPB interagissant avec différents sites de fixation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les propriétés de fixation de la protéine et cherché à caractériser la présence d'un ou de plusieurs sites à la surface des lymphocytes T. Etant donné que la CyPB est une protéine basique et qu'elle possède dans son extrémité N-terminale une région riche en lysine et arginine, nous avons étudié plus particulièrement ses interactions avec l'héparine et d'éventuels GAG sulfatés exprimés à la surface des lymphocytes T. De plus, le domaine catalytique des CyPs a souvent été décrit dans la littérature comme intervenant dans des interactions avec des protéines cibles. Nous avons alors recherché l'implication de ce domaine dans la fixation de la CyPB avec un éventuel second type de récepteur.

Sur la base de ces travaux, nous avons étudié les propriétés de ces différents types de récepteurs dans le devenir de la CyPB, en nous intéressant plus particulièrement à la transduction d'éventuels signaux transmembranaires et aux mécanismes d'internalisation de la protéine seule ou complexée à la CsA.

Enfin, nous nous sommes intéressée aux rôles de la CyPB et de ses récepteurs dans l'activité immunosuppressive de la CsA. En effet, en se fixant spécifiquement à la surface des lymphocytes T, le complexe CyPB/CsA pourrait permettre un ciblage du médicament vers ces cellules sensibles et ainsi favoriser son incorporation et son activité immunosuppressive.

## I- FIXATION DE LA CYPB A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES

### A- Fixation de la CyPB à la surface des cellules de lignées lymphoblastiques

La fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes a tout d'abord été étudiée par cytofluorimétrie en flux, en prenant comme modèle cellulaire la lignée lymphoblastique T Jurkat. Pour cette étude, les cellules ont été incubées en présence de concentrations croissantes en CyPB, la protéine fixée a ensuite été détectée après reconnaissance par un anticorps polyclonal anti-CyPB, suivi d'un second anticorps fluorescent. Par cette approche, nous avons pu déterminer la gamme de concentrations pour lesquelles la fixation membranaire de la CyPB était effective. Ainsi, la fixation de la protéine est observée dès 5 nM, et atteint un plateau apparent à partir de 50 nM. Ces résultats suggèrent que la CyPB se fixe de manière saturable et dépendante de la concentration. Cependant, cette méthode n'est pas assez sensible pour déterminer les paramètres de fixation de la protéine et ne permet pas de soustraire les interactions non spécifiques.

La fixation spécifique de la CyPB a alors été étudiée à l'aide du ligand radiomarqué. La fixation non spécifique a été obtenue en présence de 500 excès molaires de CyPB non marquée, et soustraite de la fixation totale. Ainsi, nous avons confirmé que la fixation de la CyPB est spécifique, dépendante de la concentration et saturable à partir de 50 nM. Par l'analyse des données selon la méthode de Scatchard (1949), nous avons pu estimer la constante de dissociation  $K_d$  à  $12 \pm 2$  nM et le nombre de sites à  $35.000 \pm 1.700$ /cellule.

Cette étude a été élargie aux cellules des lignées T humaines Molt-4 et HSB2 ainsi qu'à celles des lignées B humaines LiCr et Raji. La fixation de la CyPB a été observée uniquement à la surface des cellules T, avec des paramètres de fixation similaires à ceux obtenus pour les cellules Jurkat. Par contre, aucune fixation spécifique n'a été observée à la surface des cellules B (Tableau V).

Nous avons ensuite étudié la spécificité de reconnaissance de la CyPB pour ses sites de fixation exprimés à la surface des cellules T Jurkat. Des expériences de compétition ont été réalisées avec d'autres ligands potentiels susceptibles d'interagir avec les mêmes sites de fixation. Ainsi, la CyPA et la CyPC présentent des homologies structurales avec la CyPB, en particulier au niveau du site catalytique. Le lysozyme est une protéine très basique, également présente dans le lait de Femme et de masse moléculaire voisine de celle de la CyPB.

**Tableau V : Paramètres de fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB à la surface des cellules de lignées lymphocytaires humaines.** Les cellules (4.10<sup>6</sup>/ml) ont été incubées en présence de concentrations croissantes en [<sup>125</sup>I]-CyPB pendant 1 h à 4°C. La fixation spécifique est calculée après soustraction des interactions non spécifiques, obtenues en présence de 500 excès molaires en CyPB non marquée. Les paramètres de fixation (Kd, nombre de sites) sont déterminés après traitement des données par la méthode de Scatchard.

	Fixation spécifique	Kd (nM)	Nombre de sites/cellule
<b>Cellules T :</b>			
Jurkat	+	12 ± 2	35.000 ± 1.700
Molt-4	+	11 ± 2	27.000 ± 1.400
HSB2	+	9 ± 2	30.000 ± 2.150
<b>Cellules B :</b>			
LiCr	-	/	/
Raji	-	/	/

Toutefois, aucune de ces protéines ne déplace de façon significative la CyPB radiomarquée fixée à la surface des cellules T Jurkat, ce qui suggère que la fixation ne fait intervenir ni le site catalytique commun aux différentes isoformes des CyPs, ni des interactions ioniques non spécifiques.

Par contre, le ligand radiomarqué est déplacé de manière identique en présence d'excès molaires de CyPB froide libre ou complexée à la CsA. Ce résultat confirme que le domaine catalytique, recouvert par la CsA, n'est pas impliqué dans les interactions avec les sites de fixation membranaires. Toutefois, il pourrait également refléter la dissociation d'une partie du complexe au cours de l'incubation, rendant alors le site catalytique de la CyPB accessible.

Etant donné que les isoformes de CyPs diffèrent essentiellement par leurs extrémités N- et C-terminales, il est probable que la CyPB interagisse de façon spécifique avec ses sites de fixation par l'intermédiaire d'une région localisée dans ces structures non communes. Afin de vérifier cette hypothèse, des peptides de synthèse correspondant aux extrémités N- et C-terminales de la CyPB et des protéines modifiées, soit par mutagenèse dirigée, soit par voie chimique, ont été testés pour leur capacité à déplacer la CyPB radiomarquée fixée à la surface des cellules T Jurkat. Seuls le peptide N-terminal de la protéine et la protéine chimère CyPB/A, correspondant à la CyPA flanquée de l'extrémité N-terminale de la CyPB, déplacent la [<sup>125</sup>I]-CyPB fixée. Ces résultats sont en faveur d'un rôle important de l'extrémité N-terminale de la CyPB dans la reconnaissance des sites de fixation exprimés à la surface des cellules T. Cependant, les inhibitions provoquées par le peptide N-terminal ( $CI_{50} = 2,2 \mu\text{M}$ ) et la protéine CyPB/A ( $CI_{50} = 21 \mu\text{M}$ ) sont beaucoup plus faibles que celle provoquée par la CyPB ( $CI_{50} = 300 \text{ nM}$ ), et les deux compétiteurs ne déplacent pas la totalité du ligand radiomarqué, même utilisés à des concentrations élevées. Ainsi, si le peptide N-terminal de la CyPB semble être nécessaire pour la fixation de la CyPB, ces résultats suggèrent également l'existence d'une seconde région de la protéine interagissant avec les sites de fixation membranaires exprimés à la surface des cellules T.

Pour plus de détails sur ces premiers résultats, nous avons ajouté en annexe les articles traitant la fixation de la CyPB sur la lignée T Jurkat (Allain *et al.*, 1994 ; Mariller *et al.*, 1996b). Dans la suite de notre travail, nous nous sommes intéressée plus particulièrement aux sites de fixation de la CyPB exprimés à la surface des lymphocytes circulants.

## B- Fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T circulants

### 1- Fixation de la CyPB marquée à la fluorescéine

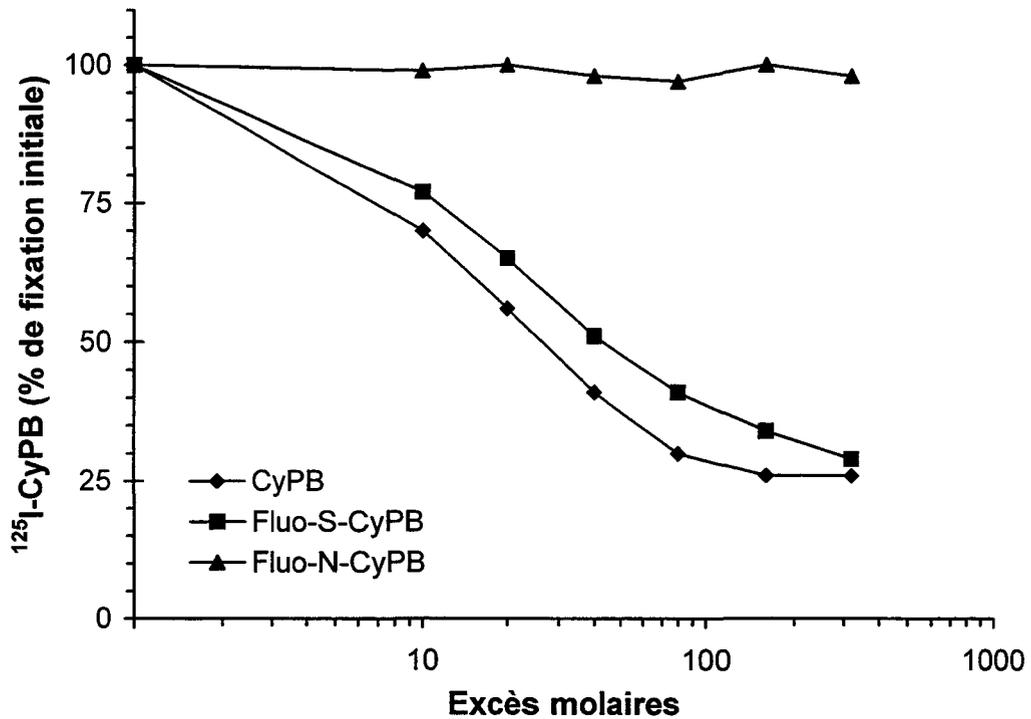
Afin d'étudier la fixation spécifique de la CyPB par cytofluorimétrie en flux, nous avons réalisé le marquage de la CyPB avec la fluorescéine pour obtenir un ligand fluorescent, ce qui nous a permis de soustraire les interactions non spécifiques en présence de ligand non marqué.

#### *a. Préparation de la CyPB fluorescente*

Afin de vérifier si la CyPB marquée à la fluorescéine conserve ses propriétés de fixation, des expériences de compétition ont été réalisées entre la [<sup>125</sup>I]-CyPB et soit la CyPB froide, soit des CyPB conjuguées à la fluorescéine. Deux CyPB fluorescentes, nommées CyPB-N-fluorescéine et CyPB-S-fluorescéine, ont été préparées avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et avec le maléimide-5-fluorescéine, qui réagissent spécifiquement et respectivement avec les groupements amines et thiols.

Afin de vérifier leur capacité de fixation, les PBL ont été incubés en présence de 25 nM de [<sup>125</sup>I]-CyPB et de concentrations croissantes en compétiteurs, CyPB native et ses dérivés fluorescents. Comme le montre la Figure 12, la CyPB-N-fluorescéine n'inhibe pas la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB, ce qui suggère que la fixation du FITC détruit les propriétés de fixation de la CyPB. En modifiant les conditions de marquage, le rapport fluorescéine/protéine n'est jamais inférieur à 2,5. Ces résultats sont conformes aux précédents travaux qui ont montré que le domaine de fixation de la CyPB est partiellement localisé au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine (Mariller *et al.*, 1996b). En effet, cette région contenant cinq résidus lysine, il est fort probable que le marquage d'au moins deux de ces résidus induise un encombrement stérique dans cette région suffisant pour abolir la fixation de la CyPB.

Par contre, le maléimide-5-fluorescéine, spécifique des groupements thiols, marque la CyPB avec un rapport fluorescéine/protéine de 0,8, ce qui est cohérent avec le fait que la CyPB ne possède qu'un seul résidu de cystéine dans son extrémité C-terminale. La CyPB-S-fluorescéine inhibe à 50% la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB en présence de 40 excès molaires tandis que la concentration inhibitrice à 50% (CI<sub>50</sub>) de la CyPB froide est de 25 excès molaires. Cette différence peut s'expliquer par un léger encombrement stérique provoqué par la présence du fluorophore conduisant à une légère perte d'affinité pour la CyPB-S-fluorescéine. Cependant, la protéine ainsi modifiée conserve ses propriétés de fixation et peut donc permettre de visualiser la fixation de la CyPB par cytofluorimétrie en flux.



**Figure 12 : Compétition de fixation de la  $[^{125}\text{I}]$ -CyPB sur les lymphocytes.** Ces expériences sont réalisées en incubant les lymphocytes en présence de 25 nM de  $[^{125}\text{I}]$ -CyPB et de concentrations croissantes en CyPB non marquée, CyPB-N-fluorescéine ou CyPB-S-fluorescéine. Après 1 h d'incubation, les cellules sont lavées et la radioactivité associée aux membranes est comptée et exprimée en pourcentage par rapport à la fixation de la CyPB radiomarquée en absence de compétiteur. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois expériences.

Ces résultats confirment que la cystéine est suffisamment distante du domaine de fixation pour autoriser le marquage de la CyPB par un groupement spécifique des thiols sans détruire ses propriétés de fixation.

*b. Fixation de la CyPB-S-fluorescéine à la surface des lymphocytes circulants*

Pour l'analyse en cytofluorimétrie en flux, les cellules ont été incubées en présence de 100 nM de CyPB-S-fluorescéine, concentration correspondant à la saturation de fixation déterminée précédemment à partir des cellules Jurkat. Le profil obtenu montre la présence de deux pics d'intensité de fluorescence différente, caractéristique de la présence de deux populations de cellules interagissant différemment avec la CyPB. L'incubation en présence de 100 excès molaires de CyPB non marquée conduit à une disparition du pic de plus forte intensité de fluorescence. Ces résultats démontrent que la fixation de la CyPB-S-fluorescéine sur les PBL est spécifique et confirme que la CyPB modifiée sur son unique cystéine est une sonde efficace pour étudier la fixation de la CyPB (Figure 13A).

La superposition du premier pic de fluorescence de la fixation totale avec l'histogramme de fluorescence de la fixation non-spécifique démontre que ce pic correspond à une population ne fixant pas la CyPB (population négative notée CyPB<sup>-</sup>). Le second pic correspondant à la population de cellules fixant la CyPB (population positive notée CyPB<sup>+</sup>) présente une large variation d'intensité de fluorescence, caractéristique d'une fixation hétérogène. Cette hétérogénéité de fixation de la CyPB peut s'expliquer par des variations du nombre de sites de fixation exprimés sur les différentes cellules de cette population. L'analyse comparée de la fixation de la CyPB chez plusieurs donneurs sains montre que la fixation présente également d'importantes variations interindividuelles (n = 20 individus différents). En effet, la population des lymphocytes CyPB<sup>+</sup> représente 20 à 60% des lymphocytes circulants en fonction des individus.

2- Fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB

Afin de vérifier les observations précédentes, nous avons étudié la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes en utilisant le ligand marqué à l'iode<sup>125</sup>. La fixation non-spécifique a été obtenue en présence de 200 excès molaires de CyPB non marquée. Le non-spécifique a été retranché de la fixation totale afin d'obtenir la fixation spécifique. Les paramètres de

fixation ont été déterminés après linéarisation des courbes de saturation par la méthode de Scatchard.

La [ $^{125}$ I]-CyPB interagit avec les lymphocytes T circulants de façon spécifique, saturable et dépendante de la concentration (Figure 14A). La saturation, reflétant le nombre de sites disponibles pour la CyPB, est très variable. En effet, le nombre de sites varie de 34.500 à 130.000 sites/cellule selon les individus ( $73.920 \pm 35.800$  sites/cellule ;  $n = 6$ ). Toutefois, l'affinité reste constante ( $15 \pm 4$  nM). Ces résultats confirment l'hétérogénéité interindividuelle, déjà observée par cytofluorimétrie en flux, de la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T.

Après élimination de la [ $^{125}$ I]-CyPB non fixée, la radioactivité associée aux membranes décroît au cours du temps lorsque les cellules sont incubées à 4°C dans un milieu dépourvu en ligand radiomarqué. Ce phénomène est d'autant plus marqué lorsque les cellules sont incubées en présence de 10 excès molaires de CyPB froide, traduisant la réversibilité de la fixation.

### 3- Comparaison de la fixation de la CyPB entre les lymphocytes quiescents et activés

La fixation de la CyPB fluorescente à la surface des lymphocytes T activés a été étudiée et comparée aux lymphocytes T quiescents chez les mêmes individus. Pour ces expériences, les PBL ont été stimulés pendant 72 h en présence d'anticorps monoclonaux anti-CD3. Le rendement d'activation a été estimé par cytofluorimétrie en flux en mesurant le taux de prolifération des lymphocytes activés. Il atteint  $65 \pm 11$  % selon les individus.

#### *a. Fixation de la CyPB fluorescente*

L'analyse des cytogrammes représentant la taille des cellules en fonction de leur granulométrie permet de distinguer deux régions correspondant à deux populations de lymphocytes. La petite région R1 correspond aux lymphocytes quiescents, tandis que la grande région R2 correspond aux lymphocytes activés (Figure 13). Les histogrammes respectifs de la fixation de la CyPB sur les lymphocytes quiescents ou activés sont constitués de deux pics de fluorescence. Néanmoins, le déplacement du pic de fluorescence correspondant à la population CyPB<sup>+</sup> est moins importante pour les lymphocytes activés. Les  $\Delta$ VMF (variation of fluorescence mean value) sont respectivement de  $115 \pm 44$  % et de  $69 \pm 26$  % pour les lymphocytes quiescents et activés. Cette diminution de l'intensité de

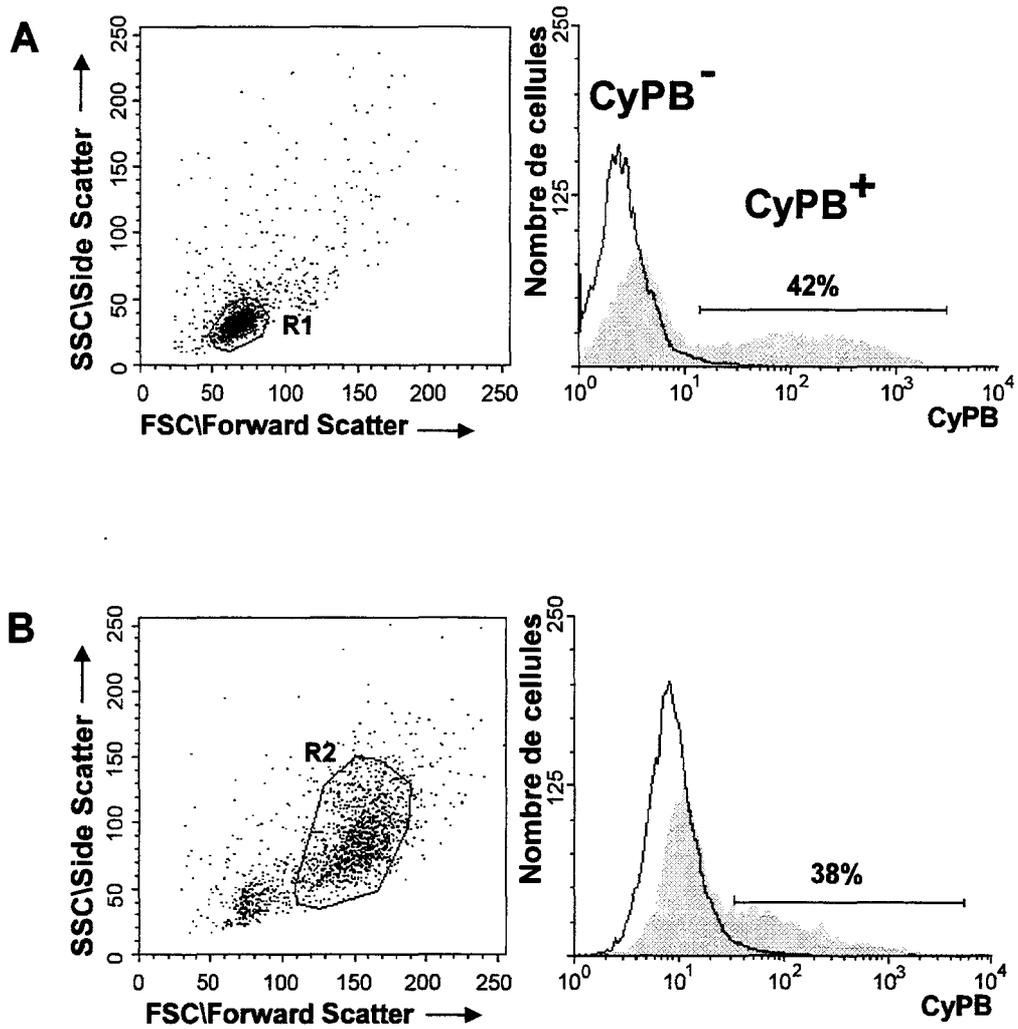
fluorescence suggère une fixation plus faible de la CyPB après activation, reflétant soit une diminution globale du nombre de récepteurs, soit l'apparition de cellules CyPB<sup>-</sup> dans les lymphocytes activés.

Dans la population des lymphocytes quiescents, le nombre de cellules CyPB<sup>+</sup> représente  $36 \pm 11$  % des PBL totaux avec une  $\Delta$ VMF de  $384 \pm 25$  %. Par contre, pour les lymphocytes activés, le nombre de cellules positives CyPB<sup>+</sup> représente  $32 \pm 12$  % des PBL totaux avec un  $\Delta$ VMF de  $154 \pm 13$  %. La fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes activés est ainsi réduite d'un facteur 2,5 par rapport à celle mesurée sur les lymphocytes quiescents. De plus, ces résultats démontrent que cette baisse de fixation observée sur les lymphocytes activés n'est pas due à l'apparition de lymphocytes incapables d'interagir avec la CyPB mais bien à une diminution du nombre de sites de fixation par cellule.

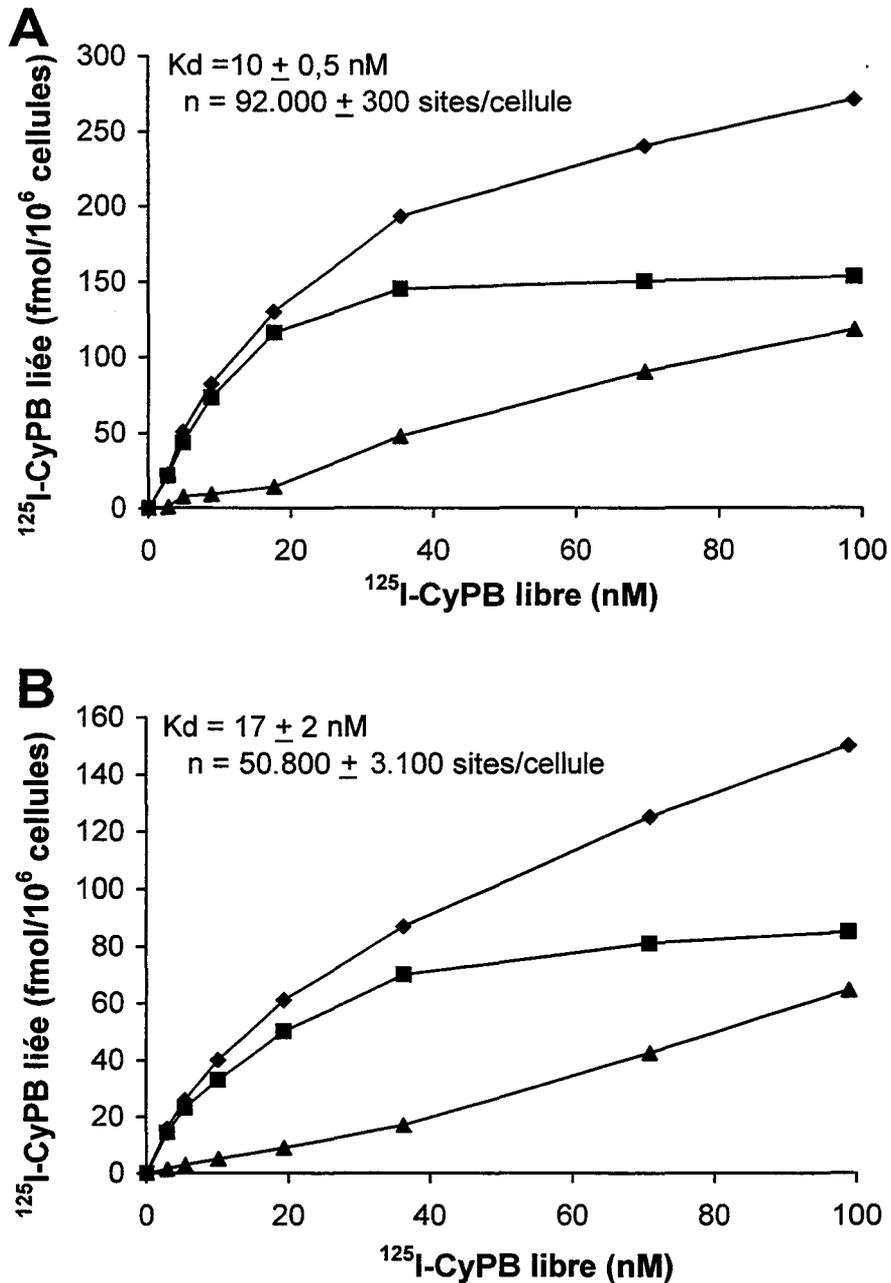
#### *b. Fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB*

En utilisant la [<sup>125</sup>I]-CyPB, la fixation du ligand à la surface des lymphocytes activés présente les mêmes caractéristiques que celle observée avec les lymphocytes quiescents. En effet, elle est spécifique, saturable et dépendante de la concentration (Figure 14). Toutefois, les lymphocytes activés montrent une capacité de fixation environ 1,5 fois plus faible que celle des lymphocytes quiescents. Les affinités de la CyPB pour ces deux types de cellules restent cependant similaires. En effet, l'analyse en Scatchard donne un Kd de  $16 \pm 5$  nM et un nombre de sites de  $59.500 \pm 23.130$ /cellule pour les lymphocytes quiescents contre un Kd de  $17 \pm 4$  nM et seulement  $38.600 \pm 8.870$  sites/cellule pour les lymphocytes activés (n = 3 individus différents). Toutefois, la différence de fixation entre lymphocytes quiescents et activés observée avec la [<sup>125</sup>I]-CyPB est moins marquée qu'avec la CyPB fluorescente. En effet, par cytofluorimétrie en flux, les cellules activées sont analysées séparément des autres cellules de la population lymphocytaire, alors que le ligand radiomarqué ne permet d'estimer que la fixation globale sur toutes les cellules de la population.

Malgré tout, la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB reste moins élevée sur les lymphocytes activés, confirmant les résultats obtenus par cytofluorimétrie en flux. Au cours de l'activation, le nombre de sites de fixation de la CyPB décroît, alors que l'affinité n'est sensiblement pas affectée, ce qui suggère que l'activation induit une régulation négative de l'expression des sites de fixation lymphocytaires de la CyPB.



**Figure 13 : Fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes quiescents (A) et activés (B).** Les cellules ont été incubées en présence de 100 nM de CyPB-S-fluorescéine. Après lavage, la fixation de la CyPB (histogramme grisé) est analysée par cytofluorimétrie en flux. La fixation non-spécifique (histogramme blanc) est obtenue par incubation du ligand fluorescent en présence de 100 excès molaires de CyPB non marquée. Les lymphocytes sont cultivés pendant 3 jours en présence ou en absence d'anticorps anti-CD3 (50 ng/ml). Les régions représentées dans les cytogrammes correspondent aux populations des lymphocytes quiescents (R1) et des lymphocytes activés (R2). Les histogrammes représentent la fixation de la CyPB à la surface des cellules de chaque population. Le pourcentage de cellules fixant la CyPB est indiqué au-dessus de la population CyPB<sup>+</sup>. Les résultats proviennent du même individu, et sont représentatifs de plusieurs expériences réalisées avec 17 individus différents.



**Figure 14 : Fixation de la [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB à la surface des lymphocytes quiescents (A) et activés (B).** La fixation de la CyPB radiomarquée est étudiée en incubant les cellules pendant 1 h à 4°C avec les concentrations indiquées de [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB. La fixation spécifique (■) est obtenue par soustraction du non-spécifique (▲) de la fixation totale (◆). Les points correspondent à la moyenne de valeurs en triplicate obtenues à partir d'un individu. L'exemple montré est représentatif de plusieurs expériences réalisées avec 3 individus différents.

#### 4- Phénotype des cellules fixant la CyPB

Les lymphocytes circulants sont constitués de plusieurs sous-populations caractérisées par l'expression de marqueurs de surface spécifiques. Ainsi, la fixation hétérogène de la CyPB observée sur les lymphocytes circulants pourrait être relative à une expression variable des sites de fixation de la CyPB parmi ces différentes sous-classes. Afin d'identifier le phénotype des PBL qui fixent la CyPB, les cellules ont été incubées en présence de CyPB-S-fluorescéine et d'anticorps dirigés contre des antigènes de surface spécifiques à certaines populations de lymphocytes. L'analyse a été réalisée par cytofluorimétrie en flux par une technique de double marquage (Figure 15). La fixation de la CyPB est visualisée par son groupement fluorescéine (fluorescence FL1) et celle des anticorps anti-marqueur de surface par conjugaison à la phycoérythrine (fluorescence FL2). La distribution de la fixation de la CyPB parmi ces différentes sous-populations a été étudiée chez 11 donneurs sains et est représentée dans le Tableau VI.

Le CD3 est l'antigène membranaire le plus représentatif des lymphocytes T (Figure 15a). Ce marqueur est présent sur 50 à 70% des PBL totaux. Toutes les cellules fixant la CyPB sont retrouvées dans cette sous-population (Figure 15b). Le CD19, HLA-DR et le CD16 sont respectivement des marqueurs spécifiques pour les lymphocytes B, les lymphocytes B et T activés et les cellules NK. Aucune fixation de la CyPB n'est associée à ces différentes sous-populations. Ces résultats sont en accord avec nos précédents travaux qui ont montré que la CyPB se lie spécifiquement aux lymphocytes T (Allain *et al.*, 1994).

Cependant, seulement  $60 \pm 20\%$  des cellules  $CD3^+$  interagissent spécifiquement avec le ligand, ce qui suggère que tous les lymphocytes T n'expriment pas les sites de fixation de la CyPB. Les cellules T sont divisées en lymphocytes auxiliaires et cytotoxiques/suppresseurs, sous-populations exprimant respectivement les marqueurs CD4 et CD8. Les cellules  $CD4^+$  et  $CD8^+$  sont représentées en proportion équivalente dans la population totale des lymphocytes mais la fixation de la CyPB se répartit différemment entre ces deux populations (Figure 15c,d). En effet,  $64 \pm 16\%$  des cellules  $CD4^+$  et  $43 \pm 15\%$  des cellules  $CD8^+$  fixent la CyPB. De plus,  $62 \pm 19\%$  des PBL-CyPB<sup>+</sup> sont localisés dans la sous-classe  $CD4^+$  et  $37 \pm 16\%$  dans la sous-classe  $CD8^+$ , confirmant que seuls les  $CD3^+$  fixent la CyPB et que les sites de fixation se distribuent entre les sous-populations  $CD4^+$  et  $CD8^+$ .

Nous avons alors étudié la distribution des sites de fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes exprimant l'antigène CD28, représentant une sous-population des lymphocytes T. Le CD28 est plus exprimé sur les cellules  $CD4^+$  que sur les cellules  $CD8^+$  (June *et al.*, 1990).

Ainsi, le taux de cellules CD28<sup>+</sup> fixant la CyPB est intermédiaire à celui des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, suggérant que la fixation de la CyPB n'est pas limitée à cette sous-population.

Les lymphocytes peuvent également être classés en fonction de leur degré de maturation. On distingue les lymphocytes naïfs (cellules n'ayant jamais rencontré l'antigène, et sensibles à l'IL2) et les lymphocytes mémoires (cellules ayant déjà rencontré l'antigène puis retournés à l'état de quiescence, elles sont moins sensibles à l'IL2), selon leur dépendance à l'IL2. Bien qu'aucun marqueur ne soit suffisamment sélectif pour discriminer ces phénotypes, le marqueur CD45 est le plus souvent utilisé afin d'étudier ces deux sous-populations (Akbar *et al.*, 1991). L'isoforme CD45RA est exprimée sur la majorité des lymphocytes T naïfs tandis que la forme tronquée CD45RO est surtout limitée aux lymphocytes T mémoires. La fixation de la CyPB se répartit en égales proportions entre les populations RA et RO (Figure 15e, f). De plus, la somme des cellules doubles positives CD45RA<sup>+</sup>/CyPB<sup>+</sup> ( $25 \pm 7\%$ ) et des cellules CD45RO<sup>+</sup>/CyPB<sup>+</sup> ( $16 \pm 5\%$ ) est égale à la proportion de lymphocytes CD3<sup>+</sup> qui fixent la CyPB, soit  $36 \pm 10\%$  des PBL totaux. Ces résultats confirment que les cellules CD45RA<sup>+</sup> et CD45RO<sup>+</sup> qui fixent la CyPB sont effectivement des lymphocytes T et que l'expression des sites de fixation pour la protéine ne dépend pas de l'état de maturation des lymphocytes T circulants.

## C - Discussion

Dans cette première partie, nous avons étudié la fixation globale de la CyPB à la surface des lymphocytes humains. Pour cela, nous avons utilisé le ligand radiomarqué et nous avons développé une méthode directe de détection des sites de fixation de la CyPB par cytofluorimétrie en flux.

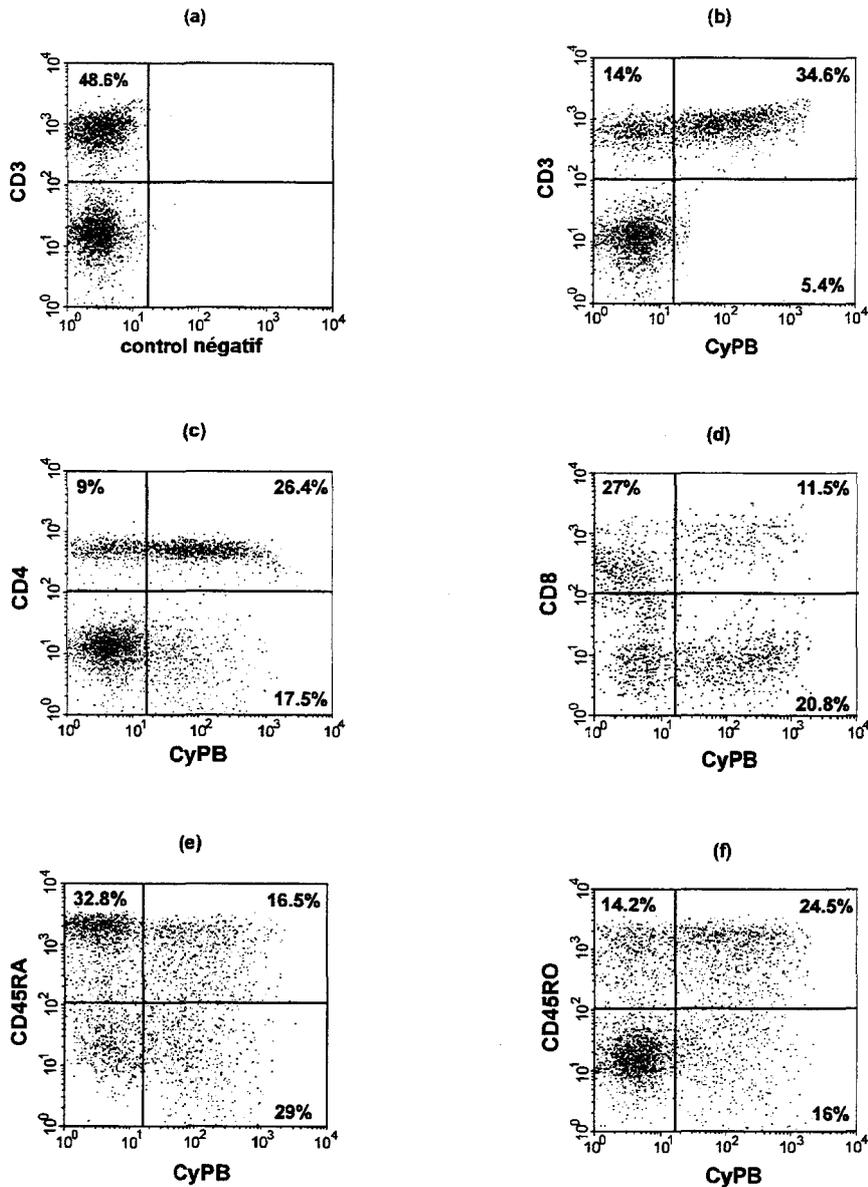
Le problème majeur était de préparer un ligand fluorescent conservant ses propriétés de fixation. Nous avons alors testé deux sondes différentes de fluorescéine, le FITC et le fluorescéine-5-maléimide, qui réagissent spécifiquement et respectivement avec les groupements amines et thiols. La CyPB-N-fluorescéine est incapable d'interagir avec les lymphocytes. Ces résultats sont en accord avec nos travaux préliminaires (Mariller *et al.*, 1996b) qui ont démontré l'implication des 24 premiers résidus d'acides aminés N-terminaux. En effet, cette région contient 5 résidus de lysine et la modification d'au moins deux de ces résidus est sans doute suffisante pour provoquer un encombrement stérique et abolir les propriétés de fixation de la CyPB.

**Tableau VI : Distribution des sites de fixation de la CyPB dans les différentes sous-classes de lymphocytes.** Les PBMC ont été incubés en présence de CyPB-S-fluorescéine et d'anticorps anti-marqueur lymphocytaire. Les cellules sont ensuite analysées par cytofluorimétrie en flux. La fréquence des cellules positives représente les cellules exprimant soit les marqueurs lymphocytaires (CD<sup>+</sup>), soit le récepteur de la CyPB et les marqueurs lymphocytaires (CyPB<sup>+</sup>/CD<sup>+</sup>). Le rapport correspond à la fréquence des cellules exprimant le récepteur de la CyPB dans chaque sous-classe. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D. obtenues lors de différentes expériences réalisées avec 11 donneurs sains.

Fréquence des cellules positives parmi les différentes sous-classes de lymphocytes

PBMC (%)	CD+	CyPB+/CD+	Rapport
PBMC	100	40 $\pm$ 11	40 $\pm$ 11
CD3	60 $\pm$ 10	36 $\pm$ 10	60 $\pm$ 20
CD4	39 $\pm$ 8	25 $\pm$ 8	64 $\pm$ 16
CD8	30 $\pm$ 10	13 $\pm$ 5	43 $\pm$ 15
CD28	52 $\pm$ 11	26 $\pm$ 9	50 $\pm$ 20
CD45RA	67 $\pm$ 13	25 $\pm$ 7	37 $\pm$ 20
CD45RO	33 $\pm$ 8	16 $\pm$ 5	48 $\pm$ 13
CD19	15 $\pm$ 7	ND*	/
CD56	24 $\pm$ 15	ND	/
HLA-DR	16 $\pm$ 8	ND	/

\* ND, non détectable (correspond à la fixation non-spécifique)



**Figure 15 : Détection de la fixation de la CyPB à la surface des différentes sous-populations de lymphocytes.** Les lymphocytes sont analysés pour l'expression du récepteur de la CyPB et soit du CD3 (b), CD4 (c), CD8 (d), CD45RA (e) ou du CD45RO (f). Le control négatif (a) est obtenu par incubation des cellules avec 100 excès molaires de CyPB non marquée. Les quadrants sont placés de telle façon que les cellules fixant non-spécifiquement la CyPB restent dans les quadrants de gauche. Les nombres indiqués correspondent aux pourcentages de cellules positives dans chaque quadrant. Fluorescence 1 = signaux de la fluorescéine (CyPB) ; fluorescence 2 = signaux de la phycoérythrine (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA, ou anti-CD45RO). Les résultats présentés ont été obtenus à partir d'un seul individu et sont représentatifs de plusieurs expériences réalisées avec différents donneurs (n = 11).

Au contraire, la partie C-terminale, qui contient l'unique résidu de cystéine de la protéine, n'est pas impliquée dans la fixation de la CyPB (Mariller *et al.*, 1996b).

Ainsi, la modification de la CyPB sur son résidu de cystéine à l'aide d'une sonde spécifique des groupements thiols, telle que le fluorescéine-5-maléimide, nous a permis de produire une CyPB fluorescente conservant la capacité à se fixer.

La fixation de la CyPB sur les lymphocytes circulants est hétérogène, suggérant que le nombre de sites de fixation exprimés à la surface de ces cellules est très variable. Par une méthode de double marquage, nous avons montré que la CyPB interagit différemment avec les sous-populations de lymphocytes étudiées. En effet, seuls les lymphocytes T circulants sont impliqués dans la fixation de la CyPB. Ces résultats sont conformes à nos travaux préliminaires concernant la fixation de la CyPB sur les cellules de lignées humaines lymphoblastiques (Allain *et al.*, 1994). Par contre, l'expression variable de ces récepteurs semble être indépendante du phénotype des lymphocytes T. Bien que la fixation de la CyPB soit plus prononcée à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la présence de sites de fixation n'a pas pu être localisée à une seule sous-population lymphocytaire T bien caractérisée. De plus, la CyPB se fixe de façon similaire à la surface des lymphocytes T naïfs et mémoires, écartant l'hypothèse d'une régulation de l'expression de ces sites en fonction de l'état de maturation des lymphocytes T.

Le nombre de récepteurs de la CyPB diminue sur les lymphocytes activés *in vitro* par rapport aux lymphocytes quiescents. Alors que l'affinité reste semblable, le nombre de sites est fortement réduit sur les lymphocytes activés, ce qui suggère que l'activation induit une régulation négative de l'expression de ces récepteurs.

Chez un même individu, la population lymphocytaire est hétérogène du point de vue de l'état de maturation et des fonctions associées à chaque sous-population. Cette hétérogénéité lymphocytaire est également observée dans les phénomènes de variations de sensibilité cellulaire à la CsA. En effet, l'activité immunosuppressive repose essentiellement sur l'inhibition de l'activation des lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup>. Ces cellules jouent un rôle crucial dans le contrôle de la réponse immunitaire, notamment en synthétisant de nombreuses lymphokines. Ces facteurs, en particulier l'IL2, stimulent d'autres cellules immunocompétentes comme les lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup> et provoquent par voie autocrine l'expansion clonale des lymphocytes T auxiliaires activés. La CsA, en bloquant la synthèse d'IL2 par les lymphocytes CD4<sup>+</sup>, agit indirectement sur les lymphocytes cytotoxiques (Bunjes *et al.*, 1981) alors qu'elle n'a aucun effet sur les lymphocytes suppresseurs (Hess &

Tatschka, 1980 ; Bucy *et al.*, 1988). De plus, les cellules mémoires sont moins sensibles à la CsA que les cellules naïves étant donné que leur prolifération n'est plus dépendante de l'IL2, mais d'un panel plus diversifié de lymphokines (Motta *et al.*, 1991). Le fait que la CyPB se fixe à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents, suggère qu'elle pourrait cibler la CsA par fixation du complexe CyPB/CsA à la surface de ces cellules sensibles au médicament.

Dans la seconde partie de notre travail, nous nous sommes donc intéressée à la nature des sites de fixation de la CyPB exprimés à la surface des lymphocytes, ceci afin de savoir s'ils sont capables d'interagir avec le complexe CyPB/CsA et d'intervenir dans un ciblage de la CsA complexée, vers les lymphocytes T.

## II- IDENTIFICATION DES SITES DE FIXATION DE LA CYPB EXPRIMES A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES T

### A - Etude des interactions entre la CyPB et l'héparine

De nombreux exemples d'interactions entre des GAG de type héparine/HS ou CS et des protéines basiques ont déjà été décrits dans la littérature. Des protéines, telles que la lactoferrine (Lf) (Zou *et al.*, 1992) et des chimiokines (Witt & Lander, 1994) interagissent avec des motifs glycaniques sulfatés par l'intermédiaire de séquences peptidiques consensus riches en acides aminés basiques. De part la nature basique et la présence d'une extrémité N-terminale riche en lysine, la CyPB représente aussi une protéine susceptible d'interagir avec des GAG sulfatés exprimés à la surface des cellules.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps étudié les interactions de la CyPB avec l'héparine. Pour cela, nous avons analysé les propriétés de fixation de la CyPB sur un gel d'héparine-Sépharose. Dans chaque expérience, 1 µg de [<sup>125</sup>I]-CyPB (50 nM) a été incubé en présence de 300 µg d'héparine immobilisée (3 mg d'héparine conjuguée par ml de gel).

#### 1- Sensibilité à la force ionique

Après avoir incubé la CyPB radiomarquée en présence d'héparine-Sépharose, la stabilité de la fixation est analysée par lavages successifs du gel à l'aide de tampon PBS contenant des concentrations croissantes en NaCl. Seuls 8% de la radioactivité sont éliminés par un lavage PBS-0,15 M NaCl, ce qui signifie que 92 % de la [<sup>125</sup>I]-CyPB restent associés au gel. Ce résultat confirme que la CyPB se lie bien à l'héparine. La stabilité à la force ionique de la liaison CyPB/héparine est étudiée par lavages successifs de la colonne à l'aide de tampons PBS contenant des concentrations croissantes en NaCl, ceci afin d'éluer tout ou en partie la [<sup>125</sup>I]-CyPB fixée au gel (Tableau VII). A partir de 0,6 M en NaCl, 90% de la [<sup>125</sup>I]-CyPB sont élués de la colonne. A 1 M en NaCl, tout le ligand est décroché, ce qui suggère que la fixation de la CyPB à l'héparine ferait intervenir des liaisons ioniques entre la protéine basique et les groupements sulfates branchés à l'héparine, interactions déstabilisées à partir de 0,6 M en NaCl.

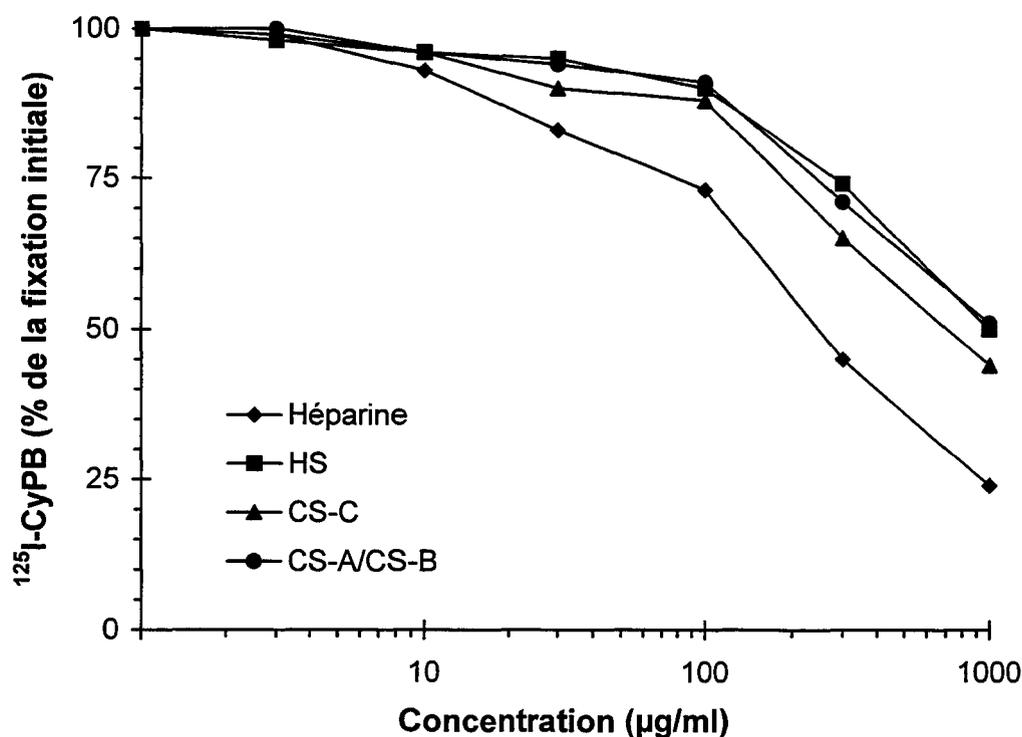
## 2- Inhibition de fixation de la CyPB par les glycosaminoglycannes

La spécificité de liaison de la CyPB pour l'héparine est étudiée grâce à des expériences de compétition avec d'autres GAG. Les différents GAG compétiteurs utilisés pour ces expériences sont : 1) l'héparine, 2) un HS isolé de cellules endothéliales du rein, 3) un chondroïtane sulfate C (CS-C) (isolé de cartilage), 4) un mélange de chondroïtane sulfate A et chondroïtane sulfate B (CS-A/CS-B) isolé de mucines, et 5) l'acide hyaluronique. Les colonnes d'héparine-Sépharose ont été incubées en présence de [<sup>125</sup>I]-CyPB et différentes concentrations en GAG pendant 1 h à température ambiante (Figure 16). Comme attendu, le ligand est facilement déplacé de la colonne par l'héparine libre, et la concentration nécessaire pour décrocher 50% de la [<sup>125</sup>I]-CyPB fixée est de 250 µg/ml. En effet, à cette concentration, le ligand se partage en égale proportion entre les formes soluble et conjuguée de l'héparine. Par contre, les autres GAG sulfatés nécessitent des concentrations plus élevées pour déplacer 50% de la [<sup>125</sup>I]-CyPB fixée, soit 700 µg/ml de CS-C et 1000 µg/ml de CS-A/CS-B ou de HS, et l'acide hyaluronique est inefficace.

Ces résultats suggèrent un rôle important du taux de sulfatation des chaînes glycaniques. En effet, l'acide hyaluronique, qui n'est pas sulfaté, ne perturbe pas la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB sur l'héparine. De plus, les CS et l'HS, qui déplacent peu la CyPB fixée, sont substitués respectivement par 1 et 2-3 groupements sulfates par unité disaccharidique, alors que 4 sulfates sont branchés par unité d'héparine. Cependant, la présence d'ions sulfates n'est pas seule responsable de l'interaction de la CyPB avec l'héparine. En effet, l'addition de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à des concentrations allant jusqu'à 10 mM ne perturbe pas cette interaction. A ces concentrations, la quantité d'ions sulfates libres apportée n'est pas suffisante pour produire une force ionique conséquente à une inhibition de fixation, mais elle est nettement supérieure à celle portée par l'héparine. Si ces différences de fixation peuvent également s'expliquer par des différences de structure entre les CS et l'héparine, par contre, ils sont plus surprenants pour l'HS qui possède une structure disaccharidique identique. Cependant, il est maintenant bien démontré que le taux de sulfatation et la position des sulfates confèrent des conformations différentes aux motifs héparine et HS, et donc des sites d'interactions différents pour des ligands potentiels (Gallagher *et al.*, 1992). Ainsi, il semble que la fixation de la CyPB sur les molécules de type GAG soit spécifique d'un motif héparinique ayant un taux de sulfatation élevé.

**Tableau VII : Elution de la [ $^{125}$ I]-CyPB fixée à l'héparine-Sépharose.** Après fixation sur le gel héparine-Sépharose, la [ $^{125}$ I]-CyPB est éluée par lavages successifs en présence de PBS à concentrations croissantes en NaCl. Les pourcentages correspondent à la quantité de radioactivité éluée du gel par rapport à la quantité initialement déposée.

NaCl (M)	% de CyPB éluée
0,15	8 ± 1,5
0,3	35 ± 3
0,6	96 ± 5
1	98 ± 2



**Figure 16 : Inhibition de fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB sur héparine-Sépharose par différents GAG.** Après avoir déposé la [ $^{125}$ I]-CyPB sur le gel d'héparine-Sépharose, celui-ci est incubé en présence de concentrations croissantes en héparine, HS, CS-C, CS-A/CS-B ou acide hyaluronique pendant 1 h à température ambiante. La radioactivité restant associée au gel est mesurée après élimination du surnageant.

### 3- Compétition de fixation par les ligands de l'héparine

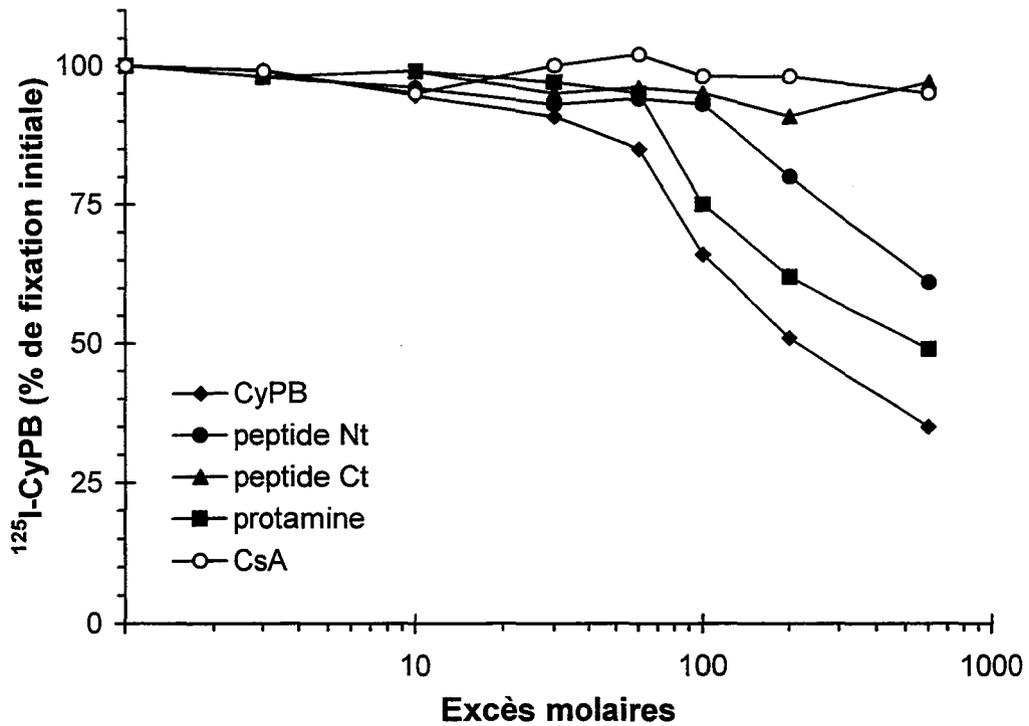
Afin de déterminer la région de la CyPB impliquée dans l'interaction avec l'héparine, le gel d'héparine-Sépharose est incubé pendant 1 h à température ambiante en présence de [<sup>125</sup>I]-CyPB et plusieurs concentrations de CyPB froide, des peptides C- et N-terminaux de la CyPB ou de protamine (Figure 17). En présence de 1 µg de [<sup>125</sup>I]-CyPB, le gel d'héparine-Sépharose n'est pas saturé en ligand, ce qui explique les concentrations élevées en compétiteurs nécessaires pour inhiber la fixation. 50% de la [<sup>125</sup>I]-CyPB fixée sont déplacés par 200 excès molaires en CyPB froide alors que la protamine, se liant à l'héparine et connue comme étant un antidote de son pouvoir anticoagulant, déplace 50% de la fixation de [<sup>125</sup>I]-CyPB par 600 excès molaires. Le peptide N-terminal de la CyPB nécessite une concentration encore plus élevée, soit près de 1000 excès molaires alors que le peptide C-terminal est inefficace. Les différences d'inhibition entre la CyPB, la protamine et le peptide N-terminal peuvent s'expliquer par des différences d'affinité pour l'héparine, mais également par des encombrements stériques différents sur les chaînes glycaniques de l'héparine, en raison des différences de masse moléculaire des ligands utilisés.

### 4- Influence de la CsA sur la fixation de la CyPB à l'héparine

Les résultats précédents suggèrent que la CyPB interagit spécifiquement avec l'héparine et que cette interaction ferait intervenir l'extrémité N-terminale riche en résidus lysine. Afin de connaître l'effet de la CsA et l'implication du site enzymatique de la CyPB dans ces interactions, plusieurs expériences ont été entreprises :

#### *a. Inhibition de fixation par la CsA*

Contrairement au peptide N-terminal, la CsA n'inhibe pas la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB, même lorsque l'immunosuppresseur est ajouté en large excès, et préincubé 30 min avec la [<sup>125</sup>I]-CyPB, afin de laisser le complexe [<sup>125</sup>I]-CyPB/CsA se former (Figure 17). Ces résultats démontrent que le site de liaison de la CsA n'est pas impliqué dans l'interaction de la protéine avec l'héparine, et que le complexe CyPB/CsA pourrait se fixer sur l'héparine.



**Figure 17 : Compétition de fixation de la  $[^{125}\text{I}]$ -CyPB pour le gel d'héparine-Sépharose par les peptides N- et C-terminaux de la CyPB, la protamine et la CsA.** Le gel d'héparine-Sépharose est incubé en présence de  $[^{125}\text{I}]$ -CyPB et de concentrations croissantes en compétiteurs. Après 1 h à température ambiante, la radioactivité restant associée est mesurée et rapportée à la quantité initialement fixée.

*b. Fixation du complexe [ $^{14}\text{C}$ ]-CsA/CyPB sur le gel d'héparine-Sépharose*

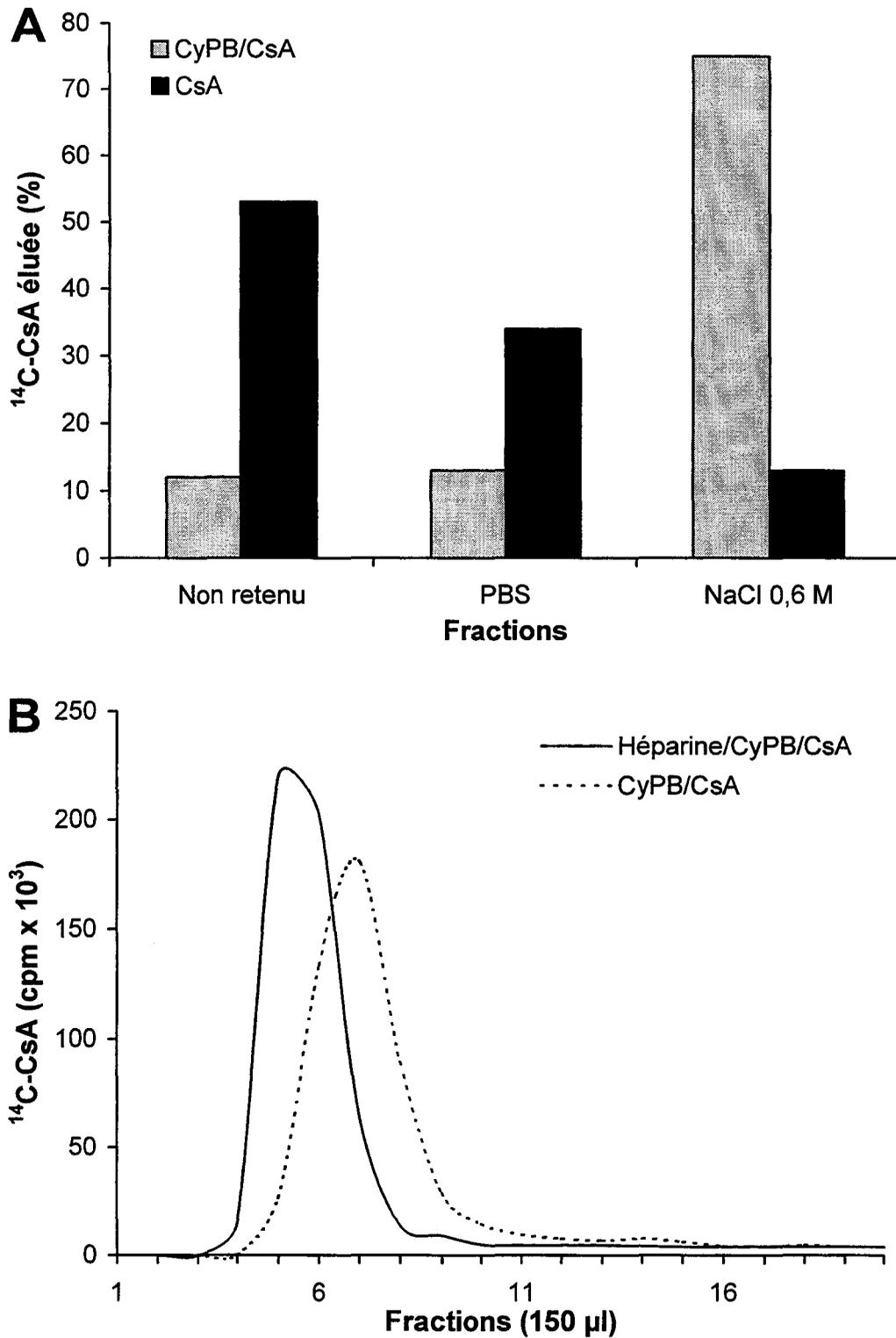
Afin de vérifier l'influence de la CsA sur la fixation de la CyPB à l'héparine, nous avons étudié l'interaction du complexe CyPB/CsA en utilisant la CsA radiomarquée (Figure 18A). Pour cela, le gel d'héparine-Sépharose (300  $\mu\text{g}$ ) a été incubé 1 h en présence de 2,5  $\mu\text{g}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]-CsA libre ou préalablement complexée pendant 30 min à température ambiante avec la CyPB (40  $\mu\text{g}$ ).

Seule, la [ $^{14}\text{C}$ ]-CsA n'est pas retenue sur le gel d'héparine-Sépharose. Elle est en majorité retrouvée dans le volume mort de la colonne. Par contre, une fois complexée à la CyPB, 88% du complexe se retrouvent associés à l'héparine. En effet, après lavage au PBS 0,15 M NaCl, 12% de la radioactivité sont élués. Comme la [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB, la majorité du complexe se décroche de la colonne d'héparine-Sépharose en présence de NaCl 0,6 M, ce qui suggère que la CsA ne gêne pas la fixation de la CyPB sur l'héparine et ne fragilise pas cette interaction.

*c. Fixation du complexe [ $^{14}\text{C}$ ]-CsA/CyPB sur colonne LH-20 en présence ou en absence d'héparine*

Afin de confirmer les résultats précédents, nous avons vérifié la stabilité du complexe héparine/CyPB/CsA. Pour ces expériences, 2,5  $\mu\text{g}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]-CsA libre ou préalablement complexée à la CyPB seule ou en présence de 150  $\mu\text{g}$  d'héparine sont déposés sur 2 ml de gel LH-20 équilibré dans du DPBS.

De part sa nature hydrophobe, la [ $^{14}\text{C}$ ]-CsA libre est retenue sur colonne LH-20, son élution est tardive et s'étend sur plusieurs fractions. Par contre, le complexe [ $^{14}\text{C}$ ]-CsA/CyPB de nature hydrophile est très peu retenu sur la colonne. Comme le montre la Figure 18B, le complexe [ $^{14}\text{C}$ ]-CsA/CyPB est élué rapidement, dès la fraction 5, et le pic d'élution symétrique ne s'étend que sur 5 fractions. En présence d'héparine, l'élution du complexe est accélérée. La radioactivité apparaît dès la 4<sup>ème</sup> fraction, et le pic d'élution est plus étroit. Ces résultats signifient d'une part, qu'en présence d'héparine, le complexe CyPB/CsA ne se dissocie pas, et d'autre part, qu'il y a formation d'un complexe plus dense et plus hydrophile que le précédent, constitué d'héparine/CyPB/CsA. En effet, le principe de la séparation sur LH-20 fait intervenir celui de chromatographie d'hydrophobicité et de gel filtration. Plus un complexe sera de haut poids moléculaire et hydrophile, plus il sera rapidement élué de la colonne.



**Figure 18 : Effet de la CsA sur la fixation de la CyPB à l'héparine.** (A) Interaction avec l'héparine-Sépharose de la [<sup>14</sup>C]-CsA libre ou complexée à la CyPB. (B) Profil d'élution du complexe [<sup>14</sup>C]-CsA/CyPB sur une colonne LH-20 en présence ou en absence d'héparine.

## 5- Conclusion

L'ensemble de ces résultats démontrent que la CyPB se lie de manière spécifique à l'héparine. Cette interaction impliquerait l'extrémité N-terminale de la protéine, et le site de fixation de la CsA ne serait pas nécessaire à cette interaction. De plus, la liaison de la CyPB à l'héparine ne perturbe pas la capacité de la protéine à fixer la CsA, permettant la formation d'un complexe héparine/CyPB/CsA.

Ainsi, l'héparine interagirait avec la CyPB par l'intermédiaire d'une région localisée dans les 24 premiers résidus. Cette région qui contient un rassemblement d'acides aminés basiques, <sup>1</sup>DEKKGPK<sup>8</sup>, est très proche des séquences peptidiques décrites dans la littérature pour intervenir dans les interactions entre les GAG sulfatés et les protéines fixant l'héparine (HBP) (Cardin & Weintraub, 1989), telles que les chimiokines et la Lf. Ainsi, la CyPB pourrait également être un membre de cette famille de protéine.

## **B - Etudes des différents sites d'interaction de la CyPB à la surface des lymphocytes circulants**

Au laboratoire, nous avons mis en évidence la présence de récepteur de la CyPB à la surface des cellules T de la lignée lymphoblastique Jurkat. La CyPB se fixe spécifiquement par l'intermédiaire de son extrémité N-terminale avec une constante d'affinité de 12 nM (Allain *et al.*, 1994). Cependant l'inhibition de la fixation par le peptide N-terminal et par la protéine chimère composée de l'extrémité N-terminale de la CyPB fusionnée à la CyPA n'est pas totale, ce qui suggère que la fixation de la CyPB ferait intervenir une seconde région de la protéine différente de l'extrémité N-terminale spécifique. Ces résultats soulèvent l'hypothèse de la présence de deux sites de fixation exprimés à la surface des lymphocytes et interagissant avec des régions différentes de la CyPB.

### 1- Effets de la force ionique et du pH

Comme nous l'avons vu précédemment, la CyPB se lie fortement au gel d'héparine-Sépharose et est éluée avec des concentrations en NaCl supérieures à 0,6 M. Nous avons alors recherché ce type d'interaction à la surface des lymphocytes T circulants. Pour cela, les cellules ont été incubées pendant 1 h à 4°C en présence de 50 nM en [<sup>125</sup>I]-CyPB et lavées par du PBS à différentes concentrations en NaCl (Tableau VIII). Le 100% correspond à la quantité totale de [<sup>125</sup>I]-CyPB fixée à la surface des cellules. A 0,6 M en NaCl, 62 ± 8% de la [<sup>125</sup>I]-

CyPB fixée sont décrochés, alors qu'à cette concentration, toute la CyPB était éluée du gel d'héparine-Sépharose. Des concentrations plus élevées en NaCl ne sont pas plus efficaces, puisqu'un lavage en présence de NaCl 1 M ne décroche que  $70 \pm 12\%$  de la [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB. De plus, à cette concentration, la fixation non spécifique augmente également, ce qui signifie que les cellules perdent leur intégrité. Ainsi, 30-40% du ligand restent associés aux cellules après lavage en présence de NaCl 0,6 M, suggérant qu'une partie de la fixation de la CyPB ne fait pas intervenir des interactions sensibles à la force ionique.

Dans la littérature, il a été montré que l'interaction de ligands polypeptidiques avec leur récepteur cellulaire protéique est dépendante du pH et que ces ligands peuvent être libérés de leur récepteur à pH acide (Massague, 1983). Afin de déterminer si la fixation résistante au lavage NaCl 0,6 M fait intervenir de interactions protéine/protéine, les cellules ont été incubées pendant 1 h à 4°C en présence de 50 nM de [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB, puis lavées par un tampon PBS/citrate pH4 (Tableau VIII). Après un tel traitement,  $34 \pm 5\%$  de la fixation sont déplacés, démontrant qu'une partie de la CyPB fixée est sensible à pH4. De plus, un lavage associant force ionique et pH acide (Glycine 0,2M / NaCl 0,5M, pH4) libère la totalité de la [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB ( $95 \pm 6\%$ ), ce qui suggère que la fixation résistante au lavage NaCl 0,6 M est sensible à pH4. Cependant, les deux lavages consécutifs ne déplacent pas toute la CyPB fixée. En effet, alors que le lavage en présence de NaCl 0,6 M décroche  $60 \pm 10\%$  de la [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB fixée, seuls  $11 \pm 5\%$  du ligand sont libérés par un second lavage à pH4. La différence peut toutefois s'expliquer par la capture d'une partie de la CyPB déplacée lors du deuxième lavage par les sites sensibles au NaCl 0,6 M rendus libres par le premier lavage, et résistants à pH acide. Ces résultats suggèrent que la CyPB possèdent des sites de fixation de deux types à la surface des lymphocytes, les sites sensibles au NaCl 0,6 M et les sites sensibles aux pH acides.

## 2- Recherche des sites de type GAG sulfatés

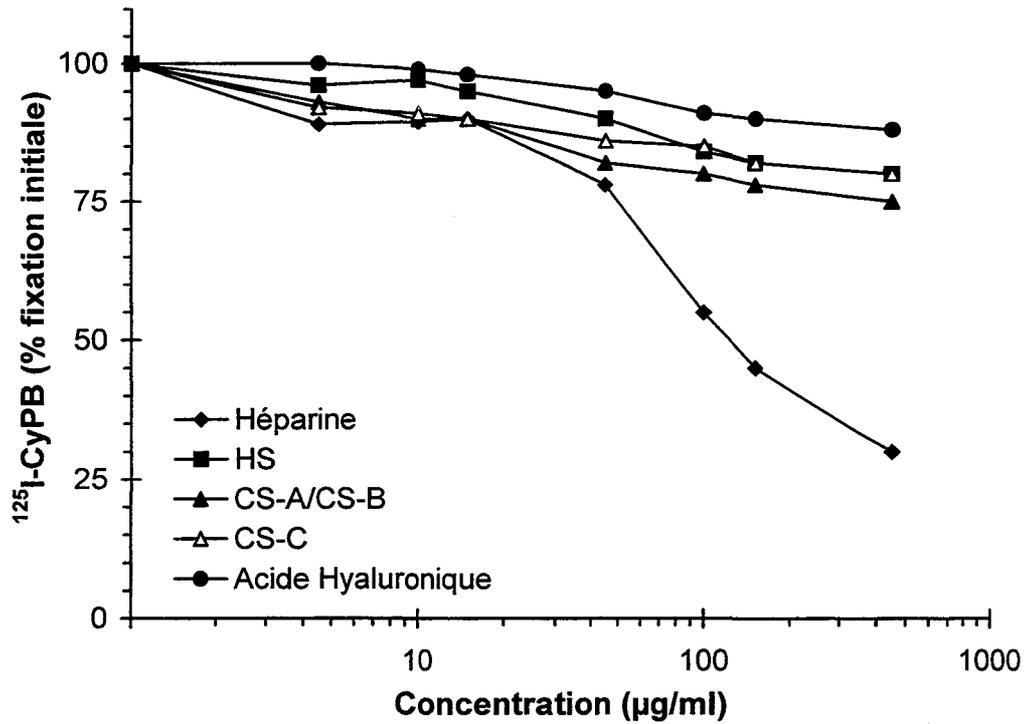
### *a. Inhibition de fixation par les GAGs*

Les interactions de la CyPB avec des GAG présents à la surface des lymphocytes ont été comparées à celles observées avec l'héparine, en réalisant des expériences de compétition en présence de différentes concentrations en héparine, HS, CS-C, CS-A/CS-B et en acide hyaluronique (Figure 19). Les cellules ont été incubées avec 50 nM en [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB et différents compétiteurs.

**Tableau VIII : Sensibilité des sites de fixation de la CyPB à la force ionique et au pH.**

Les cellules ont été incubées en présence de 50 nM de [<sup>125</sup>I]-CyPB pendant 1 h à 4°C, puis lavées par les différents tampons testés. Les pourcentages correspondent à la quantité de CyPB décrochée des cellules par rapport à la fixation initiale.

Tampon	% de CyPB décrochée
-Tp NaCl (M)	
0,3	35 ± 5
0,6	62 ± 8
1	70 ± 12
-Tp PBS/citrate pH4	34 ± 5
-Tp NaCl 0,6M	60 ± 10
Tp PBS/citrate pH4	11 ± 5
-Tp Glycine 0,2M/ NaCl 0,5M pH4	95 ± 6



**Figure 19 : Inhibition de fixation de la  $^{125}\text{I}$ -CyPB par différents GAGs sur les lymphocytes.** Les cellules ont été incubées pendant 1 h à  $4^\circ\text{C}$  en présence de 50 nM de  $^{125}\text{I}$ -CyPB et de concentrations croissantes en héparine, HS, CS-C, CS-A/CS-B et acide hyaluronique. Le pourcentage indique la quantité de  $^{125}\text{I}$ -CyPB encore fixée à la surface des cellules en présence d'inhibiteur rapportée au 100% obtenu en absence d'inhibiteur.

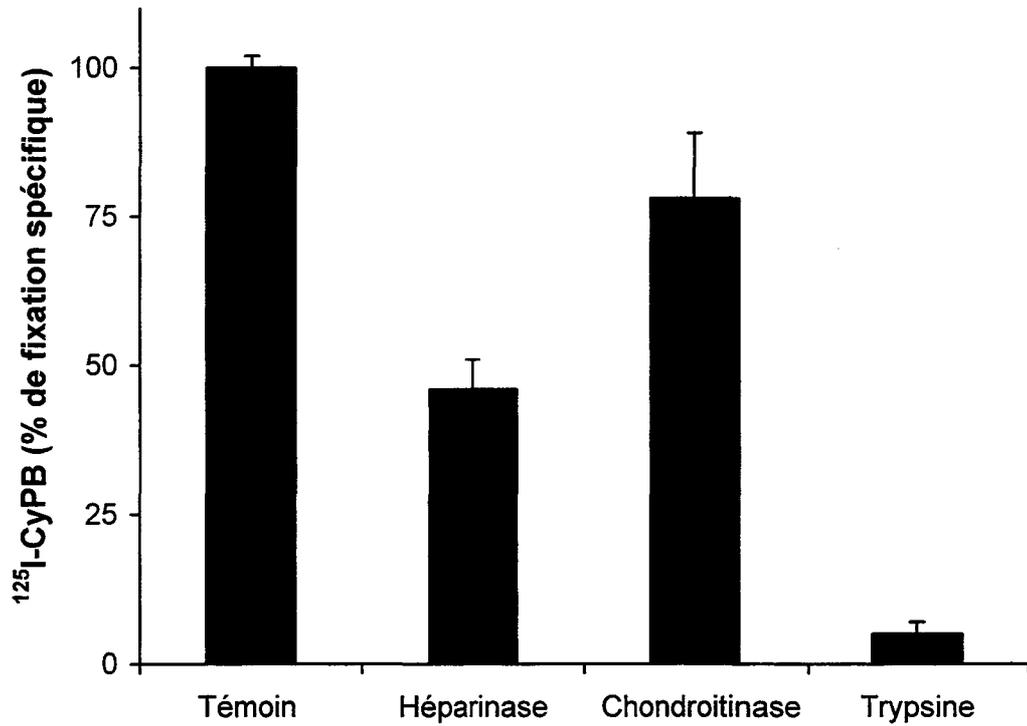
L'addition d'héparine (de 0 à 500 µg/ml) déplace facilement la [<sup>125</sup>I]-CyPB fixée à la surface des cellules. En effet, 50% de la fixation totale sont inhibés en présence de 120 µg/ml d'héparine. Par contre, l'HS, le CS-C et le CS-A/CS-B, utilisés aux mêmes concentrations, affectent dans une moindre mesure la fixation de la CyPB, et l'acide hyaluronique n'inhibe pas la fixation. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par chromatographie sur le gel d'héparine-Sépharose et suggèrent que la CyPB se fixe à des molécules d'héparine associées aux membranes ou à des constituants membranaires de type héparine.

#### *b. Traitement enzymatique des membranes*

Afin de compléter les expériences de compétition et d'identifier la nature des sites de fixation, des traitements enzymatiques des membranes ont été réalisées par l'héparinase I, la chondroitinase ABC et la trypsine (Figure 20).

L'héparinase libère les GAG de type héparine et HS, et la chondroitinase est spécifique des CS. Les conditions optimales de fonctionnement de ces enzymes ont été obtenues en traitant les lymphocytes par l'héparinase à 0,5 UI/ml ou par la chondroitinase à 10 UI/ml pendant 3 h à T° ambiante. Les cellules ont été ensuite incubées pendant 1 h à 4°C en présence de 50 nM en [<sup>125</sup>I]-CyPB afin de mesurer la perte de fixation membranaire obtenue après traitement par ces enzymes.

Après traitement à l'héparinase, 54% de la fixation spécifique ont été éliminés, démontrant que plus de la moitié des sites de fixation de la CyPB sont sensibles à cette enzyme. Par contre, après digestion par la chondroitinase, seuls 22% de la fixation spécifique sont éliminés. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus lors des expériences de compétition avec les GAG. Il semblerait en effet que la CyPB se fixe en majorité sur des GAG de type héparinique et dans une moindre mesure sur des CS. La faible inhibition observée avec l'HS isolé à partir de cellules rénales peut s'expliquer par le fait que cette forme possède une structure différente de ceux présents à la surface des lymphocytes T. De plus, le fait que les CS inhibent faiblement la fixation de la CyPB pourrait s'expliquer par leur moindre implication dans ces interactions. Ainsi, la CyPB se fixerait en partie à la surface des lymphocytes T par l'intermédiaire de GAG sulfatés spécifiques de ces cellules, essentiellement représentés par des motifs de type héparine.



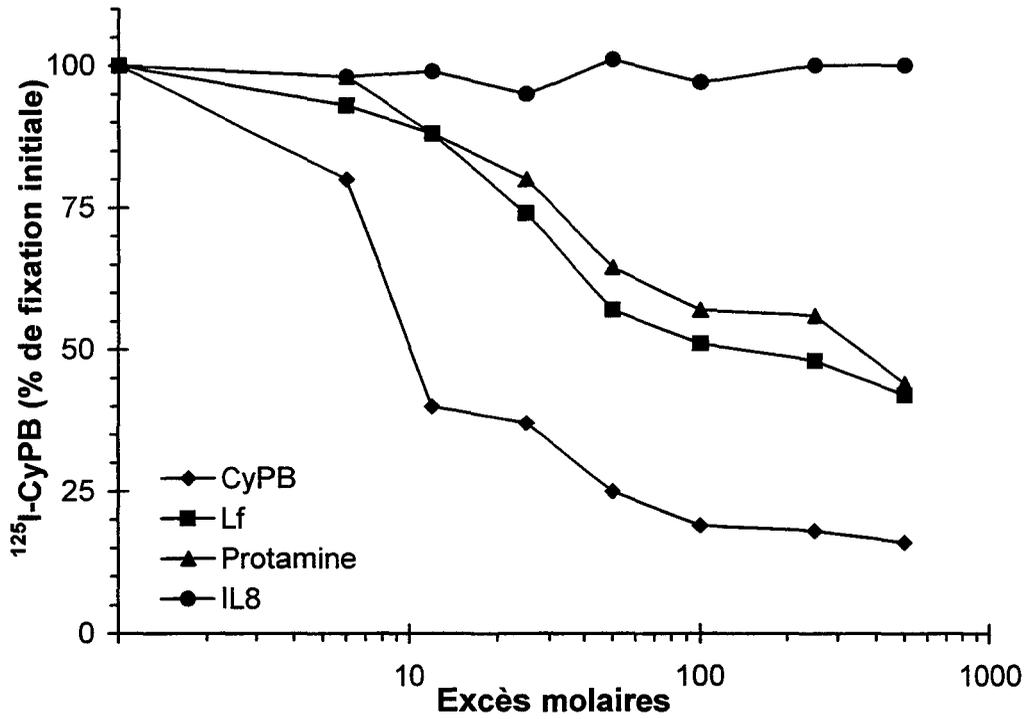
**Figure 20 : Traitement des lymphocytes par des endoglucosidases et la trypsine.** Après traitement des lymphocytes par l'héparinase (0,2 UI/ml), la chondroïtinase (10 UI/ml) et la trypsine (1 mg/ml), les cellules ont été incubées en présence de 50 nM de [ $^{125}$ I]-CyPB. La fixation non-spécifique est obtenue en présence de 200 excès molaires de CyPB non marquée. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la fixation spécifique mesurée sur les lymphocytes non traités.

Lorsque les cellules ont été traitées par la trypsine (1 mg/ml) pendant 1 h à 4°C, la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB est presque complètement éliminée. Ce résultat démontre d'une part, que les GAG fixant la CyPB sont associés à la membrane des cellules par l'intermédiaire d'une protéine, et d'autre part, que les seconds sites résistants au NaCl 0,6 M mais sensibles à pH4 sont probablement des récepteurs protéiques.

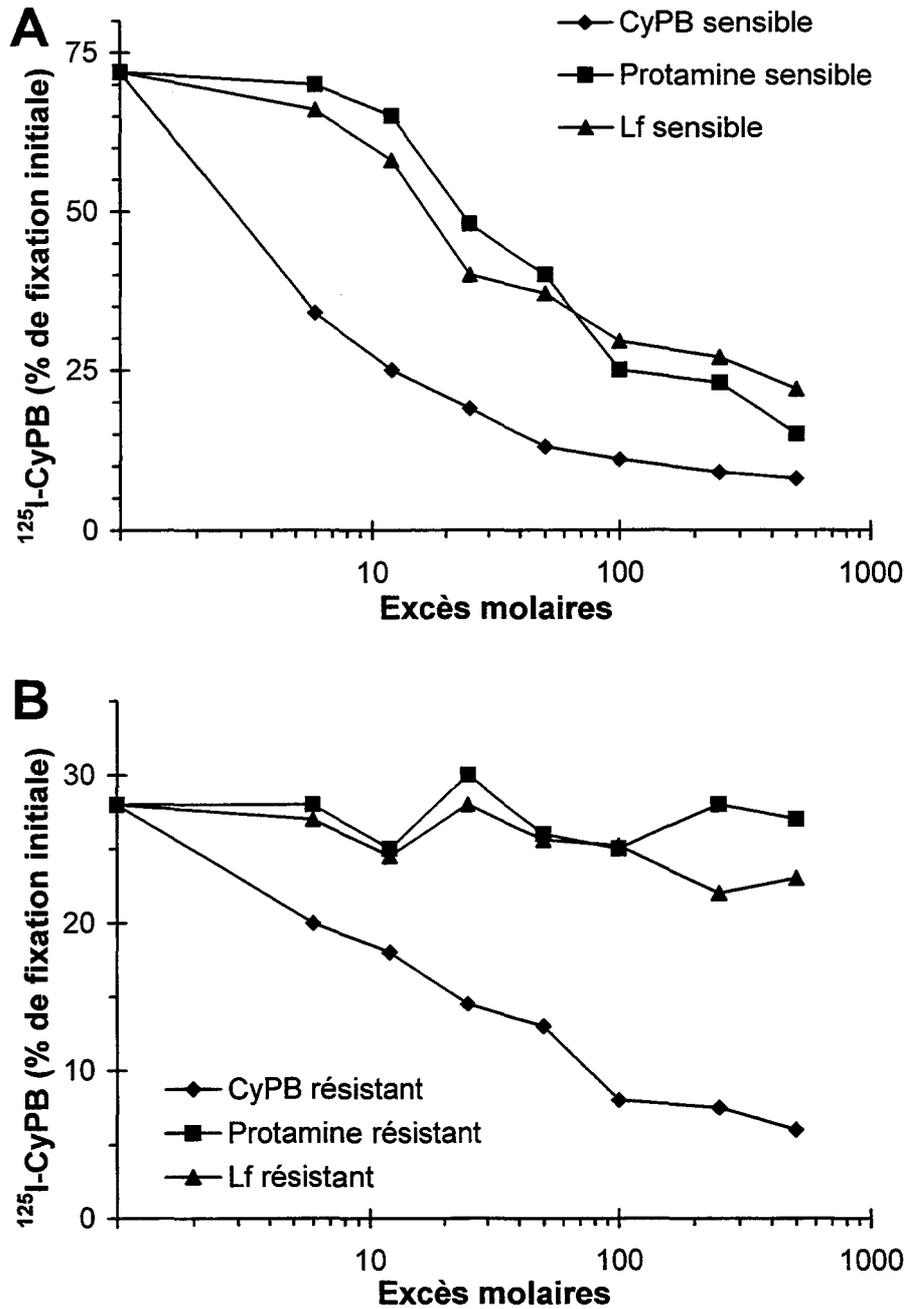
### *c. Compétition de fixation par des HBP*

Des expériences de compétition ont été réalisées avec des protéines se liant à l'héparine, telles que la protamine, une chimiokine, l'IL8 et la Lf. Ces protéines sont testées pour leur capacité à inhiber la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB à la surface des lymphocytes (Figure 21). Comme attendu, la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB est inhibée à 80% par 100 excès molaires de CyPB froide, ce qui correspond à la fixation non spécifique. Les concentrations croissantes en protamine et en lactoferrine déplacent jusqu'à 60% de la CyPB fixée, alors que l'IL8 ne perturbe pas cette fixation. Les CI<sub>50</sub> de la protamine et de la Lf sont respectivement de 19 µM et de 9 µM, alors qu'elle est de 500 nM pour la CyPB dans les mêmes conditions. Aux concentrations utilisées en protamine et en Lf, la fixation non spécifique de la CyPB n'est pas atteinte, ce qui suggère que ces deux protéines partagent avec la CyPB une partie de ses sites de fixation. Le fait que l'IL8 n'a aucun effet sur la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB pourrait s'expliquer par des sites de fixation différents entre la CyPB et l'IL8, ou par le fait que cette dernière a une affinité très inférieure à celle de la CyPB pour les sites reconnus. En effet, il a été montré dans la littérature que l'IL8 possédait une faible affinité vis à vis de l'héparine (Kd = 5,5 x 10<sup>-6</sup> M) (Witt & Lander, 1994).

Afin d'identifier les sites reconnus par les trois protéines, CyPB, Lf et protamine, les lymphocytes ont été incubés en présence de 50 nM en [<sup>125</sup>I]-CyPB et plusieurs concentrations de chaque protéine. Après 1 h d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées par du PBS-NaCl 0,6 M pour discriminer les 2 sites de fixation de la CyPB. La Figure 22A montre la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB sur les sites sensibles au NaCl, qui représentent environ 70% de la fixation totale. Ainsi, les trois protéines tendent à inhiber totalement la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB. Toutefois, les CI<sub>50</sub> de la Lf et de la protamine sont 10 fois plus élevées que celle de la CyPB froide pour ces sites. Ce résultat suggère que la Lf et la protamine partagent en commun avec la CyPB, des sites de fixation de type glycanique mais présentent des affinités plus faibles pour ces derniers.



**Figure 21 : Compétition de fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB à la surface des lymphocytes.** Les cellules ont été incubées en présence de 50 nM de [<sup>125</sup>I]-CyPB et de CyPB non marquée, de protamine, de Lf ou d'IL8 aux excès molaires indiqués. Après 1 h à 4°C, les cellules sont lavées par du PBS et la radioactivité restante associée aux membranes est comptée.



**Figure 22 : Compétition de fixation de la  $^{125}\text{I}$ -CyPB sur les sites sensibles (A) et résistants (B) au lavage NaCl 0,6 M. Les cellules ont été incubées pendant 1 h à 4°C en présence de 50 nM de  $^{125}\text{I}$ -CyPB et de concentrations croissantes en CyPB froide, protamine et Lf. Après élimination du ligand non fixé, la radioactivité restant associée aux cellules et présente dans le lavage NaCl 0,6 M a été mesurée. Le pourcentage indique la quantité de  $^{125}\text{I}$ -CyPB mesurée dans les deux fractions par rapport à la radioactivité totale obtenue en absence d'inhibiteurs.**

Par contre, ces mêmes protéines n'inhibent pas la fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB sur les sites résistants au lavage au NaCl, contrairement à la CyPB froide (Figure 22B), ce qui démontrent que la Lf et la protamine ne se fixent pas aux sites non glycaniques, spécifiques de la CyPB.

#### *d. Conclusion*

Par des expériences de compétition de fixation et par traitement enzymatique des lymphocytes, nous avons constaté que la CyPB se fixe à la surface des lymphocytes T sur des sites de nature GAG sulfatés. Ces sites de fixation représentent 60-70% de la fixation spécifique. De plus, ces résultats suggèrent également l'existence de seconds sites de fixation de nature non glycanique, résistants au lavage NaCl 0,6 M. Par contre, la sensibilité de ces seconds sites à un lavage à pH4 et leur élimination par la trypsine suggèrent qu'il s'agirait de récepteurs protéiques.

### 3- Recherche des sites non glycaniques

Afin de discriminer les sites GAG sulfatés, des sites non glycaniques, deux approches ont été utilisées : 1) après fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB, les cellules ont été lavées en présence de PBS-NaCl 0,6 M, afin de décrocher la protéine liée aux sites GAG et ainsi rendre visibles les seconds sites ; 2) la fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB sur les sites GAG a été bloquée par un excès de protamine, laissant seuls les seconds sites accessibles pour la fixation du ligand.

#### *a. Compétition de fixation de la CyPB*

Les cellules ont été incubées pendant 1 h à 4°C en présence de 50 nM en [ $^{125}$ I]-CyPB et de concentrations croissantes en compétiteurs : CyPB non marquée, CyPC ou peptide N-terminal. Après lavage par du DPBS, les cellules subissent un second lavage au PBS NaCl 0,6 M, afin d'éliminer le ligand fixé sur les GAG, et la radioactivité restant associée aux cellules est analysée en fonction des différents compétiteurs (Figure 23A). La fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB est fortement déplacée par la CyPB froide. En effet, plus de 80% de la fixation initiale sont inhibés à partir de 100 excès molaires, démontrant que la fixation sur les sites résistants au NaCl 0,6 M est spécifique. 50% de la fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB sont inhibés par 650 nM en CyPB non marquée,  $CI_{50}$  très similaire de celle observée en absence de lavage NaCl 0,6 M (750 nM). Des concentrations croissantes en CyPC inhibent également la fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB sur les sites résistants au NaCl 0,6 M. Cependant, cette inhibition est plus faible qu'avec la CyPB froide. En effet, la  $CI_{50}$  est estimée à 1,2  $\mu$ M, suggérant que la CyPC a une affinité

plus faible que la CyPB pour les sites de fixation reconnus. Par contre, le peptide N-terminal n'a aucun effet sur la fixation de la CyPB sur les sites résistants au NaCl 0,6 M.

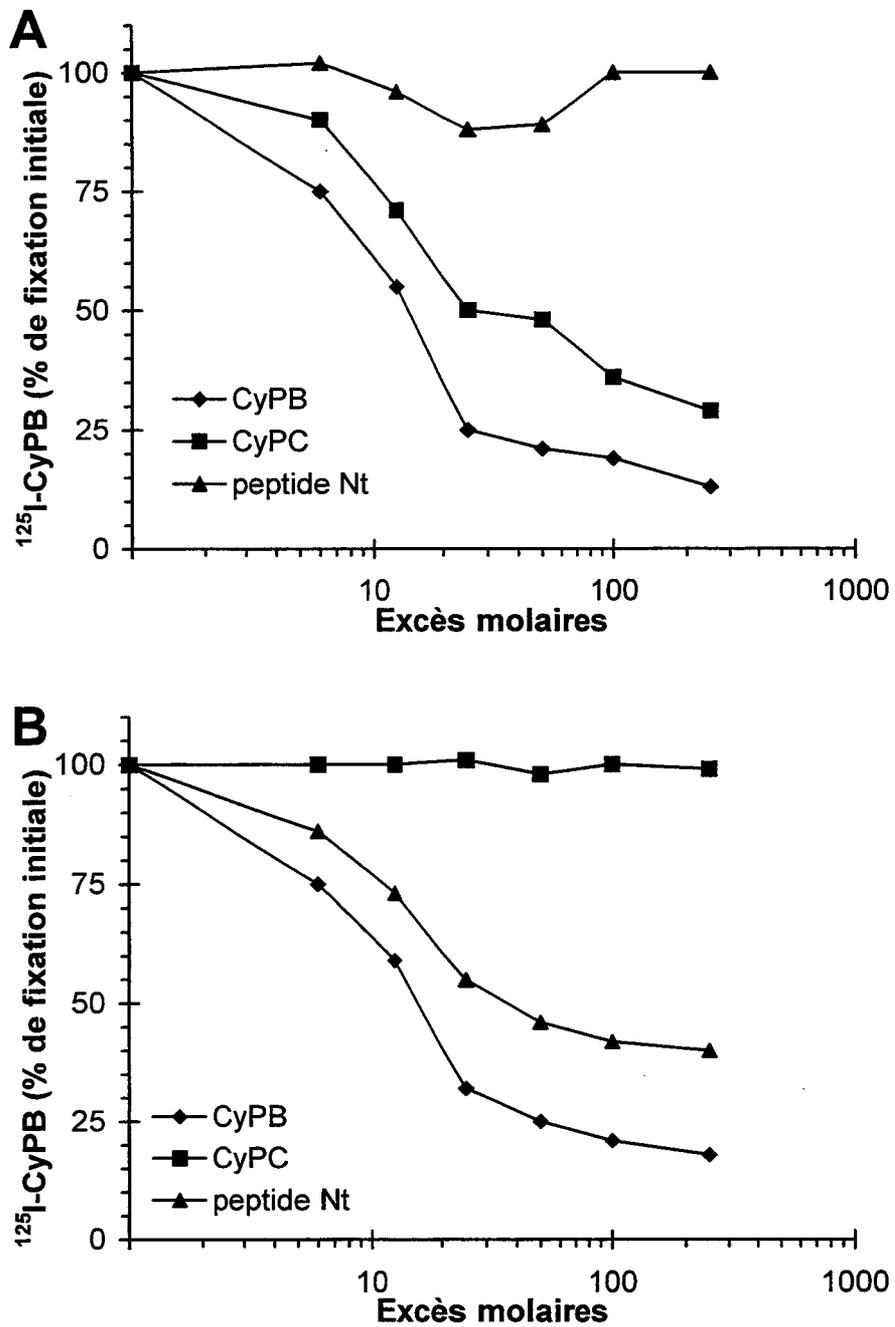
Ces résultats sont contradictoires à ceux observés en absence de lavage NaCl 0,6 M (Figure 23B). En effet, la CyPC apparaît inefficace pour déplacer la CyPB radiomarquée fixée à la surface des lymphocytes T circulants, alors que le peptide N-terminal déplace jusqu'à 60% la fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB à partir de 250 excès molaires. Ces résultats sont d'ailleurs similaires à ceux observés avec les cellules T Jurkat (Mariller *et al.*, 1996b).

Il semble donc que la spécificité de liaison de la CyPB aux sites sensibles et résistants au NaCl soit différente. En effet, nous avons vu que le peptide N-terminal inhibait la fixation de la CyPB à l'héparine et déplaçait en partie la protéine fixée à la surface des lymphocytes T, suggérant que la CyPB reconnaît les GAG sulfatés par son extrémité N-terminale. Par contre, les sites résistants au NaCl n'ont aucune affinité pour cette région. A l'opposé, la CyPC n'aurait aucune affinité pour les sites de fixation sensibles au lavage NaCl 0,6M, ce qui peut s'expliquer par l'absence du peptide N-terminal spécifique de la CyPB. Ainsi, le fait que les sites GAG sulfatés soient majoritaires peut expliquer l'absence apparente de compétition provoquée par la CyPC. Par contre, les sites résistants au NaCl 0,6 M reconnaîtraient une région commune aux deux isoformes. En effet, après avoir éliminé la fixation sur les GAG sulfatés, nous avons observé que la CyPC était capable de déplacer la CyPB fixée, suggérant la présence de récepteurs interagissant avec une région commune à ces deux isoformes. Ce site pourrait être le domaine conservé des CyPs comprenant les domaines catalytique et de fixation de la CsA.

#### *b. Importance du domaine catalytique dans la fixation de la CyPB*

##### $\alpha$ - Inhibition de la fixation par des analogues de cyclosporine

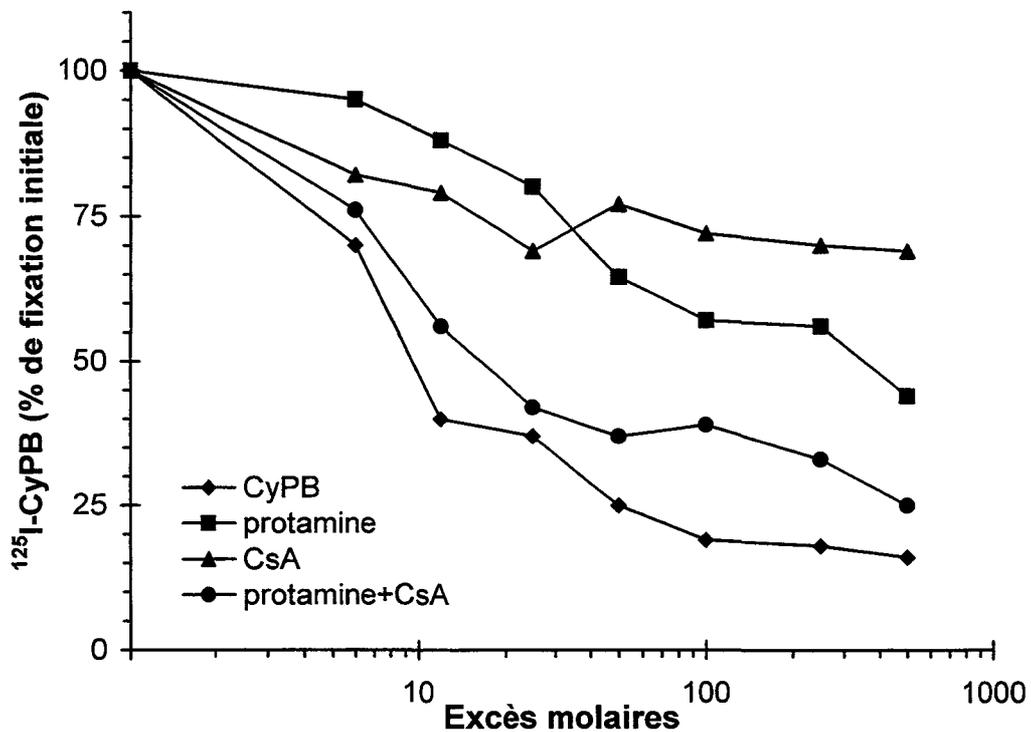
Afin d'étudier le rôle du domaine conservé de la CyPB dans l'interaction avec les sites résistants au NaCl, les cellules ont été incubées en présence de 50 nM de [ $^{125}$ I]-CyPB et de concentrations croissantes en CsA. Dès 6 excès molaires en CsA, la fixation totale de la CyPB est inhibée d'environ 25%. Cette inhibition reste ensuite constante jusqu'à 500 excès molaires de CsA (Figure 24). Des analogues de cyclosporine ont alors été utilisés afin de vérifier si cette inhibition était due à l'occupation du site enzymatique (Tableau IX). La CsG, analogue moins actif que la CsA, réduit également la fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB sur les lymphocytes.



**Figure 23 : Compétition de fixation de la  $[^{125}\text{I}]$ -CyPB par la CyPC et le peptide N-terminal après ou sans lavage NaCl 0,6 M.** Les lymphocytes ont été incubés avec 50 nM en  $[^{125}\text{I}]$ -CyPB et de concentrations croissantes en CyPB non marquée, CyPC et peptide N-terminale. Après 1 h d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées soit par du PBS-NaCl 0,6 M (A), soit par du DPBS-NaCl 0,15 M (B).

**Tableau IX : Effet de la CsA et de ses analogues sur la fixation totale de la CyPB.** Les lymphocytes ont été incubés en présence de 50 nM en [ $^{125}$ I]-CyPB et de dérivés de cyclosporine. Après 1 h d'incubation à 4°C, la radioactivité restant associée aux cellules est comparée à celle obtenue en absence d'inhibiteurs.

	Excès molaire en inhibiteur	
	10	100
CsA	75%	74%
CsG	93%	77%
CsH	102%	109%



**Figure 24 : Effets de la combinaison protamine/CsA sur la fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB à la surface des lymphocytes T.** Les cellules ont été incubées en présence de 50 nM en [ $^{125}$ I]-CyPB et soit de protamine seule, de CsA seule, ou du mélange protamine/CsA.

Cependant, elle nécessite des concentrations plus élevées, ce qui peut s'expliquer par la moindre affinité de cette analogue pour les CyPs. Par contre, la CsH qui ne se fixe pas aux CyPs, n'a aucun effet sur la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB à la surface des lymphocytes T. Ainsi, l'occupation du domaine catalytique par l'immunosuppresseur semble être nécessaire pour bloquer la fixation de la CyPB sur les sites résistants au NaCl. Ces résultats suggèrent que la région de la CyPB interagissant avec ce second site impliquerait la région conservée des CyPs.

#### β- Effet de l'association CsA et protamine

Afin de confirmer l'implication des deux régions distinctes de la CyPB dans les interactions avec les deux sites de fixation, les cellules ont été incubées pendant 1 h à 4°C en présence de 50 nM en de [<sup>125</sup>I]-CyPB et de concentrations croissantes en protamine et en CsA. Comme le montre la Figure 24, l'association CsA/protamine provoque une meilleure inhibition de la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB que les deux inhibiteurs seuls. En effet, l'inhibition provoquée par la protamine associée à la CsA est plus efficace que celle de la protamine seule pour les faibles concentrations, puis les deux courbes restent parallèles pour les fortes concentrations. Ces résultats démontrent que l'inhibition de fixation de la CyPB par la CsA s'additionne à celle produite par la protamine, suggérant la présence de deux régions distinctes de la protéine interagissant avec deux sites de fixation différents.

#### *c. Conclusion*

Les deux sites de fixation de la CyPB sur les lymphocytes T peuvent être discriminés par lavage en présence de NaCl 0,6 M, ce qui nous a permis d'étudier la spécificité du site minoritaire. La CyPB interagit avec ce site par l'intermédiaire de la région comprenant le site de fixation de la CsA, région qui, comme nous l'avons vu précédemment, n'intervient pas dans la fixation à l'héparine. En outre, le peptide N-terminal ne serait impliqué que dans les interactions avec les motifs GAG sulfatés. Ainsi, la CyPB posséderait deux domaines de fixation bien distincts, lui permettant d'interagir avec deux familles de molécules différentes présentes à la surface des lymphocytes T circulants.

#### 4- Caractéristiques des sites de fixation de la CyPB sur les lymphocytes T

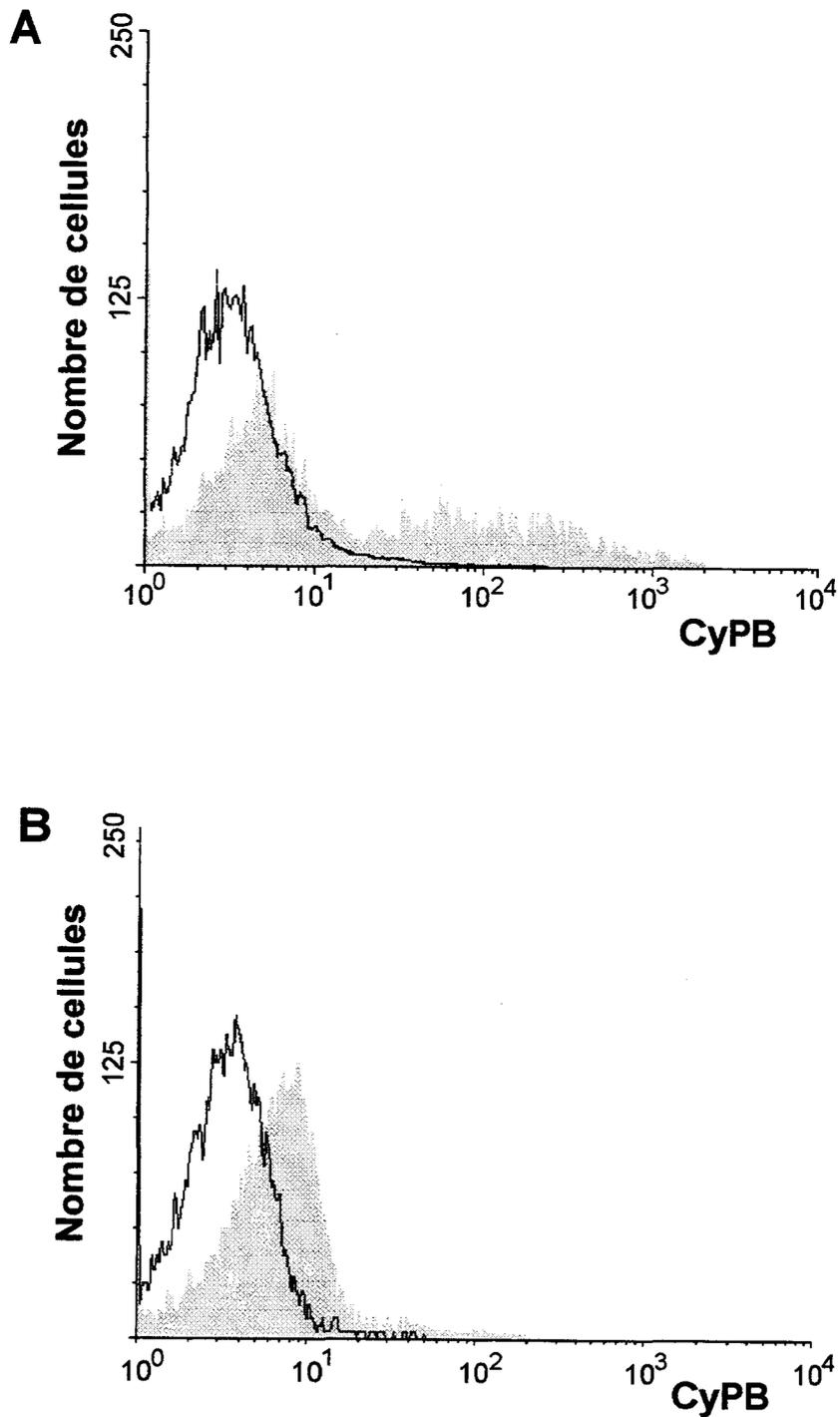
Comme nous l'avons observé dans la première partie, la fixation de la CyPB sur les lymphocytes T est hétérogène et se distribue entre les sous-populations CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

Afin d'attribuer cette hétérogénéité à l'un ou l'autre site, les cellules ont été incubées en présence de 100 nM en CyPB-S-fluorescéine puis lavées avec ou sans PBS-NaCl 0,6 M avant l'analyse au cytofluorimètre en flux.

L'intensité de fluorescence correspondant à la population fixant la CyPB est considérablement diminuée après lavage NaCl 0,6 M (n = 4 individus). Dans l'exemple représenté (Figure 25), La  $\Delta$ VMF est de 58,5 % après lavage NaCl 0,6 M alors qu'elle est de  $115 \pm 44$  % sans lavage NaCl, reflétant une diminution d'environ 50% de la fixation. De plus, l'histogramme obtenu après lavage NaCl 0,6 M est beaucoup moins étalé, suggérant une fixation plus homogène sur les sites résistants au NaCl 0,6 M. Ces résultats suggèrent que la fixation hétérogène de la CyPB observée à la surface des lymphocytes T serait due à une variation de fixation sur les sites GAG sulfatés.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons étudié la fixation de la CyPB en utilisant le ligand marqué à l'iode<sup>125</sup>. Après lavage au NaCl 0,6 M, le taux de [<sup>125</sup>I]-CyPB libéré traduit la fixation du ligand sur les sites glycaniques, alors que la quantité de radioactivité restée associée aux cellules correspond au ligand fixé sur les sites non glycaniques. La fixation non spécifique, obtenue en présence de 200 excès molaires de CyPB non marquée, est soustraite pour obtenir la fixation spécifique sur chaque famille de sites.

L'analyse, selon la méthode de Scatchard, de la radioactivité libérée ou restée associée à la membrane indique la présence d'un seul site de fixation de la CyPB dans ces 2 fractions (Tableau X). Les affinités de la CyPB pour les sites GAG sulfatés et non glycaniques sont semblables, et sont respectivement de  $10,5 \pm 1,5$  nM et de  $14 \pm 4$  nM. Ces valeurs expliquent le Kd moyen identique pour la fixation globale mesurée dans la première partie des résultats et l'impossibilité de discriminer ces deux sites par leur seule affinité pour le ligand. Les nombres de sites sont estimés à  $68.700 \pm 24.000$  sites sensibles/cellule et  $25.400 \pm 8.900$  sites résistants/cellule. Ainsi, les sites GAG représentent  $73 \pm 25\%$  des sites totaux de la CyPB à la surface des lymphocytes quiescents, confirmant les résultats précédents obtenus lors des expériences de compétition. De plus, la fixation de la CyPB sur ces sites GAG présente une hétérogénéité interindividuelle plus importante que sur les sites non glycaniques. En effet, dans nos expériences, le nombre de sites GAG varie de 31.200 à 106.100 sites/cellule selon les individus. A l'opposé, le nombre de sites non glycaniques est plus constant et varie de 10.000 à 24.500 sites/cellule (n = 5 donneurs).



**Figure 25 : Fixation de la CyPB fluorescente sur les lymphocytes avant et après lavage NaCl 0,6 M.** Les cellules ont été incubées en présence de 100 nM en CyPB-S-fluorescéine puis lavées avec du DPBS (A) ou du PBS-NaCl 0,6 M (B). Les profils grisés et blancs correspondent respectivement à la fixation totale et à la fixation non spécifique.

Ainsi, l'hétérogénéité de la fixation de la CyPB observée à la surface des lymphocytes s'expliquerait en majeure partie par des variations de fixation du ligand sur les sites GAG sulfatés.

Dans la première partie de nos résultats, nous avons également montré que le nombre de sites diminuait après activation lymphocytaire. Nous avons alors comparé la répartition des sites sensibles et résistants au NaCl sur les lymphocytes quiescents et activés. Afin de pouvoir discriminer facilement ces deux sites en présence de [<sup>125</sup>I]-CyPB, nous avons sélectionné 3 cas présentant un nombre de sites de fixation important. Après activation, une réduction significative de la fixation de [<sup>125</sup>I]-CyPB est observée aussi bien sur les sites sensibles que sur les sites résistants au NaCl 0,6 M (Tableau X). En effet, les nombres de sites GAG sulfatés sont respectivement de  $71.150 \pm 4150$  et de  $32.600 \pm 150$  sites/cellule pour les lymphocytes quiescents et activés, soit une réduction de moitié de la fixation sur ces sites majoritaires. Cette diminution peut être consécutive soit à des modifications d'ordre structural, telles que des variations de sulfatation ou une diminution de la longueur des chaînes glycaniques, résultant en une perte de reconnaissance de CyPB, soit tout simplement en une diminution de leur expression à la surface des cellules. Les seconds sites de nature protéique subissent également une diminution d'expression. En effet, les nombres de sites passent de  $28.350 \pm 3.650$  à  $14.700 \pm 450$  sites/cellule après activation, suggérant une régulation négative de l'expression de ces sites à la surface des lymphocytes activés.

## C- Discussion

Les expériences présentées dans cette deuxième partie mettent en évidence l'existence de deux sites de fixation pour la CyPB à la surface des lymphocytes T circulants. On distingue des sites sensibles à la force ionique et des sites sensibles au pH (Figure 26).

Les sites minoritaires sont de nature non glycanique et sont sensibles au pH. Après lavage au NaCl 0,6 M, la constante de dissociation apparente de ces sites est de  $14 \pm 4$  nM et le nombre de sites est estimé à  $25.400 \pm 8.900$ /lymphocyte quiescent. Les dérivés actifs de cyclosporine inhibent de 25% la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes, démontrant que l'occupation du site enzymatique bloque les interactions du ligand avec ce récepteur non glycanique.

**Tableau X : Fixation spécifique de la [<sup>125</sup>I]-CyPB sur les sites glycaniques et non glycaniques des lymphocytes quiescents et activés.** Les cellules ont été incubées en présence de plusieurs concentrations en [<sup>125</sup>I]-CyPB. Après 1 h d'incubation à 4°C, les paramètres de fixation pour les sites sensibles et résistants au NaCl 0,6 M ont été estimés par la méthode de Scatchard, et comparés à ceux de la fixation totale. Les données ont été obtenues à partir de trois individus présentant une capacité élevée de fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T.

	Lc quiescents		Lc activés	
	Kd (nM)	n (sites/cellule)	Kd (nM)	n (sites/cellule)
Fixation totale	10 ± 2	99.650 ± 7650	16 ± 2	46.150 ± 4650
Fixation sensible au NaCl	10,5 ± 2	71.150 ± 4150	15 ± 2	32.600 ± 150
Fixation résistante au NaCl	11 ± 1	28.350 ± 3650	15 ± 4	14.700 ± 450

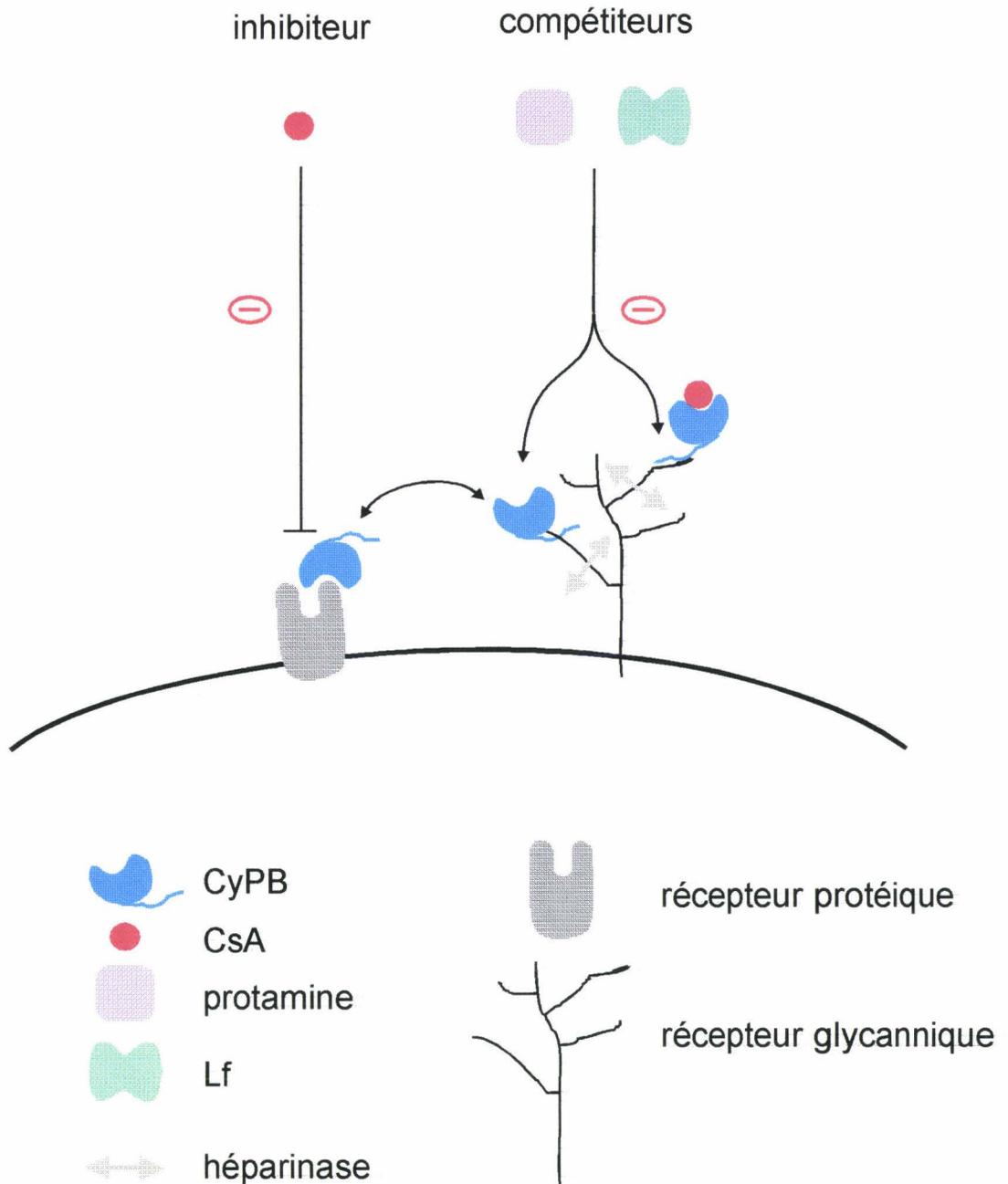
De plus, la CyPC entre en compétition avec la fixation de la CyPB sur ces sites non glycaniques, mais dans une moindre mesure par rapport à la CyPB elle-même, suggérant que ces sites de fixation de la CyPB reconnaissent un domaine conservé des CyPs, probablement le domaine catalytique. En effet, cette région est très conservée entre les différentes CyPs (Bergsma *et al.*, 1991 ; Friedman & Weissman, 1991).

Le second site de fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T est de nature glycanique sulfatée. En effet, la CyPB se lie fortement sur une colonne d'héparine-Sépharose et est éluée par des concentrations en NaCl comprises entre 0,6 et 1 M. De plus, les cellules traitées par du PBS-NaCl 0,6 M libèrent plus de 50% de la CyPB fixée, démontrant que la protéine interagit probablement avec des GAG sulfatés. La fixation de la CyPB à la surface des cellules est inhibée par l'addition d'héparine et faiblement par l'HS et les CS. Ceci ne signifie pas que l'héparine soit responsable de cette fixation, mais que les sites présents à la surface des cellules présente une affinité similaire pour la CyPB. De plus, la fixation est fortement diminuée après traitement des cellules à l'héparinase, alors que la chondroitinase affecte peu cette fixation, ce qui suggère que les sites de fixation sensibles au NaCl sont essentiellement des HS très sulfatés de structure proche de l'héparine. Ces sites glycaniques sont majoritaires ; ils sont estimés à  $68.700 \pm 24.000$  sites/lymphocyte quiescent et présentent un  $K_d$  de  $10,5 \pm 1,5$  nM (similaire à celui des sites non glycaniques). La région de la CyPB interagissant avec ces sites est localisée dans son extrémité N-terminale spécifique et limitée aux 24 premiers résidus d'acides aminés. Ces résultats sont conformes à nos précédents travaux qui ont démontré l'implication de cette région dans la fixation du ligand sur les cellules Jurkat (Mariller *et al.*, 1996b). La fixation de la CyPB sur ces sites glycaniques est inhibée par la Lf et la protamine et non par l'IL8, toutes les trois étant des HBP. Ces différences d'inhibition peuvent s'expliquer par la faible affinité de l'IL8 pour les GAG de type l'héparine/HS ( $K_d = 5,5 \times 10^{-6}$  M) (Witt & Lander, 1994), par rapport à celle de la CyPB. Par contre, la Lf présente une affinité plus importante pour l'héparine avec un  $K_d$  de l'ordre du nanomolaire. Récemment, Legrand *et al.* (1997) ont montré que la Lf se fixe à la surface des cellules T Jurkat avec un  $K_d$  de 70 nM et un nombre de sites d'environ 100.000 sites/cellule. Cependant, près de 80% de la fixation totale font intervenir des interactions entre la séquence N-terminale  $^1\text{GRRRS}^5$  de la Lf et des molécules GAG sulfatées présentes à la surface de ces cellules. De plus, cette séquence a déjà été décrite comme agissant en synergie avec la séquence  $^{28}\text{RKVR}^{31}$  afin de former un site fonctionnel de fixation de la Lf sur les GAG (Mann *et al.*, 1994). De même, la CyPB contient la séquence  $^1\text{DEKKKGPK}^8$ , qui est similaire aux

séquences consensus, XBBXBX et XBBBXXBX (où B représente des résidus basiques), impliquées dans la reconnaissance entre des HBP (Cardin & Weintraub, 1989) et les GAG sulfatés. Cette séquence étant contenue dans l'extrémité N-terminale de la CyPB, il est fort probable que le site de reconnaissance de la CyPB pour les GAG sulfatés soit limité à cette séquence.

La structure des GAG reconnus à la surface des lymphocytes T par la CyPB semble être spécifique de ces cellules, puisque seuls les cellules CD3<sup>+</sup>, et majoritairement les CD4<sup>+</sup>, fixent la CyPB. De plus, l'HS isolé de cellules de rein inhibe peu la fixation de la CyPB, ce qui confirme que les sites GAG sulfatés exprimés à la surface des lymphocytes T présentent une spécificité structurale. En effet, la structure des GAG, même au sein de la famille des HS, varie selon les tissus et les cellules, essentiellement au niveau du nombre et de la position des sulfates. L'HS est probablement le GAG le plus complexe, en terme de diversité structurale, avec des regroupements de glucosamine N-sulfate et d'iduronate contenant de nombreux sulfates substitués sur les hydroxyles, séparés par des domaines moins sulfatés et principalement N-acétylés (Gallagher *et al.*, 1992). Ces motifs très sulfatés, appelés "*heparin-like*", pourraient correspondre aux sites reconnus par la CyPB. Enfin, les GAG fixant la CyPB seraient associés à la surface des lymphocytes par l'intermédiaire d'une protéine étant donné que le traitement à la trypsine abolit la fixation. Ils pourraient s'agir de protéoglycannes membranaires tels que le CD44, ou de GAG sulfatés associés à la membrane par l'intermédiaire des récepteurs de l'héparine (Bradbury & Parish, 1989).

L'activation des lymphocytes induit une diminution du nombre de sites glycaniques sulfatés et non glycaniques. Par contre, les affinités ne varient pas. Ces résultats suggèrent une régulation négative de l'expression des sites non glycaniques ainsi qu'une modification de l'expression ou de la structure des sites glycaniques de la CyPB. En effet, plusieurs auteurs ont décrit que les lymphocytes activés synthétisent et sécrètent une quantité plus importante de GAG sulfatés que les lymphocytes quiescents (Hart, 1982 ; Wilson & Rider, 1991). Ces GAG libérés ne seraient alors plus disponibles à la fixation de la CyPB, ce qui expliquerait la diminution de fixation observée sur les lymphocytes activés. Selon Bartold *et al.* (1989), les proportions des différents GAG synthétisés par les lymphocytes sont altérées lors de la stimulation. Ainsi, les motifs *heparin-like* pourraient diminuer au profit d'autres GAG moins sulfatés, non affines pour la CyPB.



**Figure 26 : Schéma récapitulatif de la fixation de la CyPB sur ses récepteurs glycaniques et non glycaniques à la surface des lymphocytes T circulants.**

### III- DEVENIR DE LA CYPB APRES FIXATION SUR LES LYMPHOCYTES TOTAUX

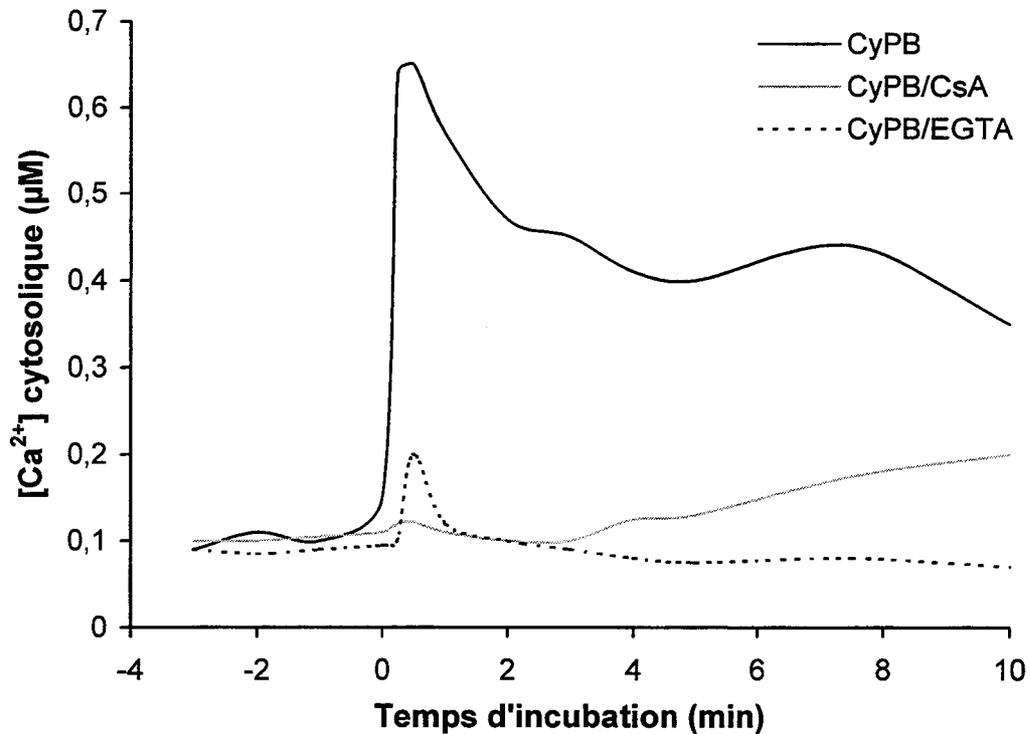
#### A- Signaux intracellulaires induits par la fixation de la CyPB

Nous nous sommes intéressés aux voies de transduction induites par la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes. Dans cette étude, nous avons analysé la présence d'un signal calcique induit par la fixation de la CyPB. Pour analyser les variations de la concentration cytosolique calcique, des expériences par cytofluorimétrie en flux ont été réalisées avec des lymphocytes préalablement chargés avec une sonde fluorescente spécifique du  $\text{Ca}^{2+}$ , le Fluo-3.

L'addition de CyPB de 50 à 500 nM induit une augmentation de la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Figure 27). Le flux calcique généré atteint un maximum dans les 30 premières secondes, de 0,3 à 0,85  $\mu\text{M}$  selon les individus ( $0,55 \pm 0,24 \mu\text{M}$  ;  $n = 6$ ), puis la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique diminue progressivement jusqu'aux taux résiduels de  $0,1 \pm 0,01 \mu\text{M}$ .

L'augmentation du taux cytosolique de  $\text{Ca}^{2+}$ , initiée par la CyPB est sévèrement affectée lorsque le milieu réactionnel est dépourvu en  $\text{Ca}^{2+}$  (PBS, EGTA 2 mM) (Figure 27). Ces résultats suggèrent que la CyPB génère un influx calcique par une entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans la cellule, probablement par l'intermédiaire d'un canal membranaire. Afin de préciser l'origine du flux calcique, nous avons alors recherché la présence d' $\text{IP}_3$ , principaux messagers impliqués dans les mouvements cellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  et générés par activation des PLC. Pour ces expériences, les cellules ont été chargées en *myo*-inositol tritié. Après stimulation par la CyPB, les inositols phosphates ont été isolés et la radioactivité associée à chaque famille ( $\text{IP}_1$ ,  $\text{IP}_2$ ,  $\text{IP}_3$ ) a été mesurée et comparée à celle obtenue en absence de CyPB. Ainsi, quelque soit la concentration en CyPB utilisée, aucune augmentation significative n'a été observée. Ces résultats démontrent que la CyPB n'active pas de PLC et que le flux calcique a une origine autre que celle du réticulum endoplasmique provoqué par l'ouverture des canaux  $\text{IP}_3$  dépendants.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la CsA sur la génération du flux de  $\text{Ca}^{2+}$  induit par la CyPB. L'addition du complexe CyPB/CsA préformé ne génère aucun flux calcique, suggérant que la région de la CyPB interagissant avec l'immunosuppresseur est nécessaire à la transmission du signal (Figure 27).



**Figure 27 : Flux calcique induit par la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes.** Les cellules préalablement chargées en Fluo-3 ont été stimulées à 37°C soit en présence de Ca<sup>2+</sup> (DPBS) par 100 nM en CyPB (—) ou en complexe CyPB/CsA (---), soit en absence de Ca<sup>2+</sup> (PBS/EGTA 2 mM) par 100 nM de CyPB (.....). Les variations de fluorescence, reflétant les changements de la concentration cytosolique en Ca<sup>2+</sup>, sont mesurées par cytofluorimétrie en flux. Le temps t = 0 correspond à l'addition du ligand à la suspension cellulaire. Les tracés représentés correspondent à la moyenne de 5 expériences réalisées avec les lymphocytes d'individus différents.

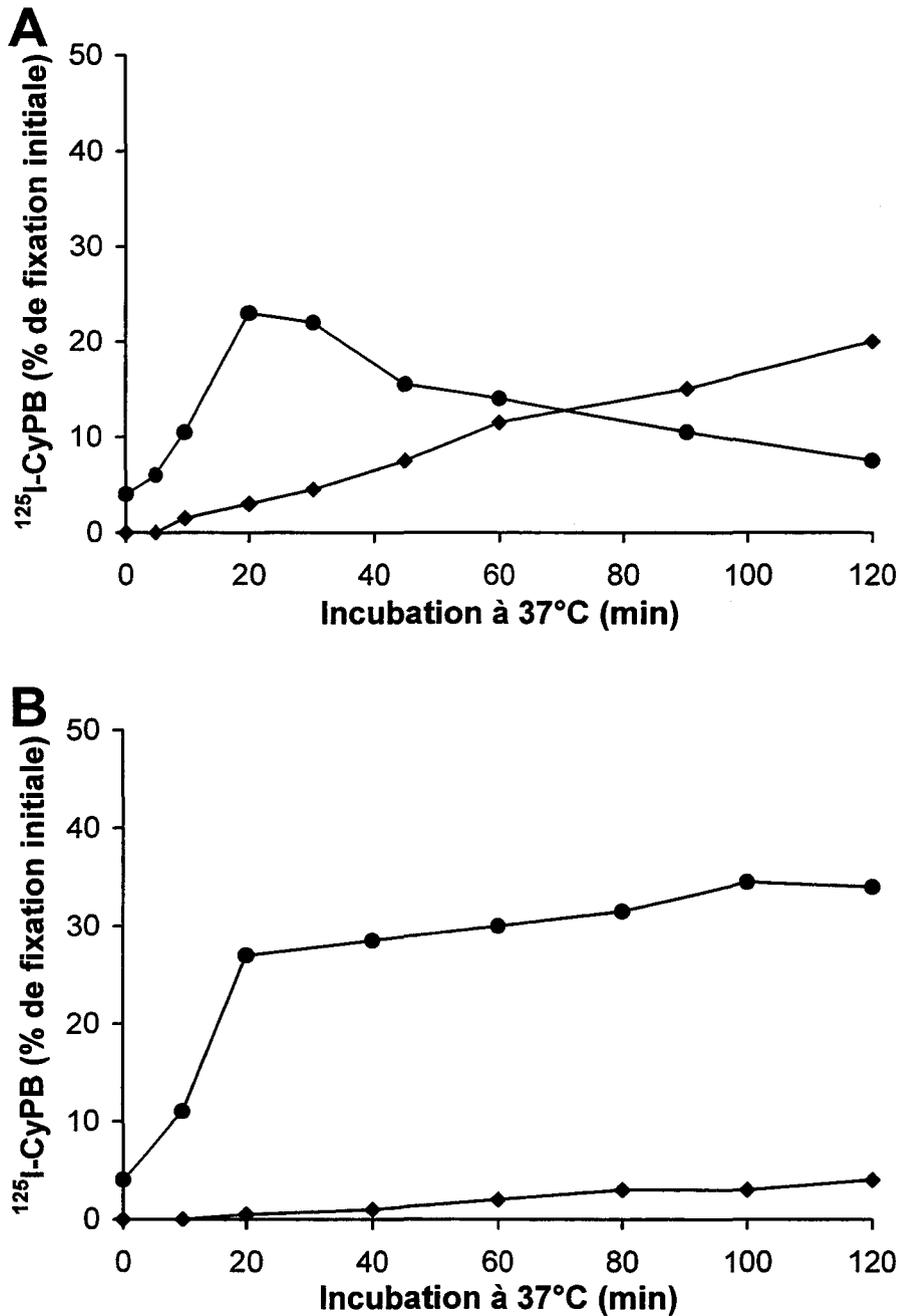
Ainsi, les sites de fixation non glycaniques, qui reconnaissent la CyPB par l'intermédiaire de la région comprenant le site catalytique, seraient associés à la transmission d'un signal intracellulaire.

## B- Endocytose de la CyPB

### 1- Internalisation de la CyPB dans les cellules Jurkat

Afin de déterminer si la CyPB est internalisée dans les cellules Jurkat, nous avons dans un premier temps, étudié les interactions du ligand radiomarqué à 4°C et à 37°C. Les cellules ont été incubées en présence de 50 nM en [<sup>125</sup>I]-CyPB, prélevées à différents temps, et traitées par la Pronase afin de discriminer la fixation membranaire (sensible à la protéolyse) du ligand internalisé (résistant à la protéolyse). La quantité de CyPB associée aux cellules à 4°C est environ 2 fois moindre que celle mesurée à 37°C, suggérant une accumulation du ligand dans les cellules à cette température. En effet, à 4°C, presque toute la radioactivité associée aux cellules est enlevée par le traitement à la Pronase, démontrant qu'il s'agit de CyPB fixée à la membrane. Par contre, à 37°C, la fraction sensible à la Pronase augmente rapidement durant les premières minutes de l'incubation, puis la fraction résistante commence à apparaître, pour atteindre un plateau correspondant à 35% de la CyPB associée aux cellules. Ces résultats suggèrent qu'à 37°C, la CyPB se fixe à la surface des cellules, puis est endocytée dans la cellule, la protégeant par conséquent de l'action de la Pronase.

Dans un second temps, nous avons étudié le processus d'endocytose de la CyPB en incubant tout d'abord les cellules en présence de ligand radiomarqué pendant 1 h à 4°C, afin de saturer les sites de fixation. Après élimination du ligand non fixé, les cellules ont été incubées à 37°C et des aliquotes ont été prélevés à différents temps. Les surnageants d'incubation ont été traités par l'ATCA, afin de séparer la [<sup>125</sup>I]-CyPB intacte (acido-précipitable) du ligand dégradé (acido-soluble). En parallèle, les cellules ont été traitées par la Pronase, afin de discriminer les fractions membranaire et internalisée. Ainsi, la fraction résistante à la Pronase augmente rapidement jusqu'à atteindre un maximum au bout de 20 min d'incubation, confirmant l'endocytose de la protéine. Après 20 min, la fraction résistante à la Pronase diminue progressivement, alors que le ligand dégradé apparaît dans le milieu d'incubation (Figure 28A). En présence de chloroquine, la radioactivité s'accumule dans la cellule et n'est plus libérée dans le milieu, démontrant que la [<sup>125</sup>I]-CyPB n'est plus dégradée (Figure 28B).



**Figure 28 : Cinétique d'endocytose de la CyPB dans les cellules T Jurkat.** Les cellules non traitées (A) et traitées (B) à la chloroquine ont été incubées en présence de 50 nM de [ $^{125}$ I]-CyPB pendant 1 h à 4°C. Après avoir éliminer le ligand non fixé, les cellules sont incubées à 37°C. Aux temps indiqués, la radioactivité est mesurée dans les surnageants d'incubation, les éluats et les culots cellulaires après traitement à la Pronase. Les ordonnées représentent les pourcentages de [ $^{125}$ I]-CyPB initialement liée aux cellules à 4°C, retrouvée dans les cellules (●), et libérée dans le milieu d'incubation sous forme dégradée (◆).

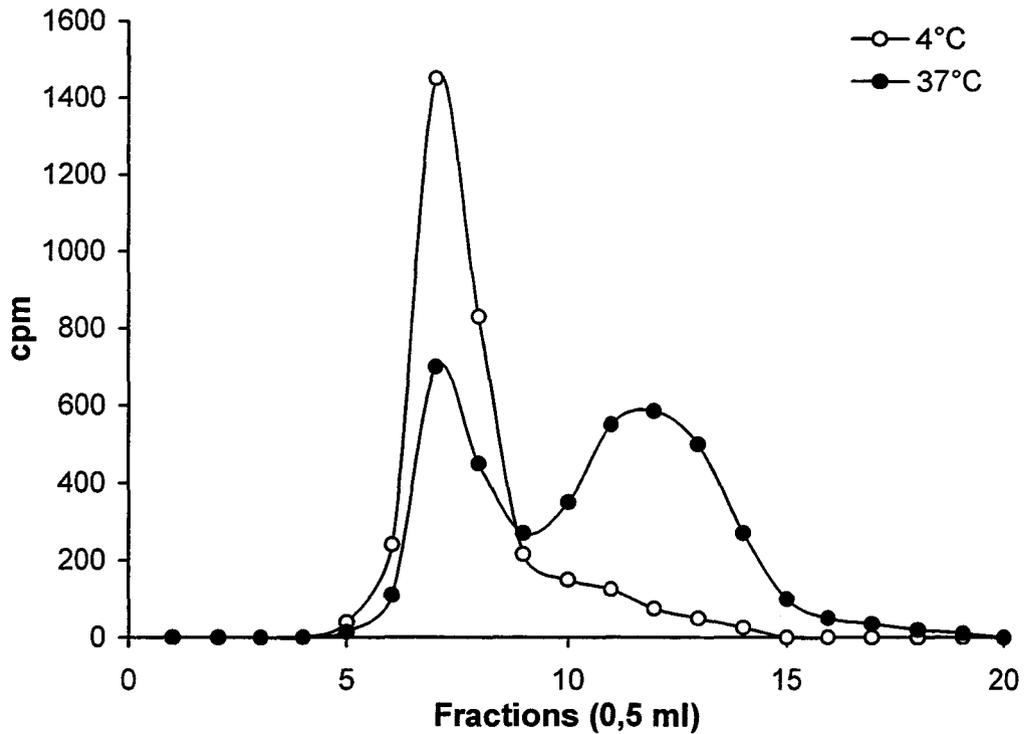
Comme dans le cas de la fixation, l'ensemble des travaux concernant l'endocytose de la CyPB dans les cellules T Jurkat figure dans l'article 1 en annexe (Allain *et al.*, 1994).

Ainsi, ces résultats suggèrent que la CyPB est internalisée à 37°C dans les cellules T Jurkat. Après son endocytose, elle entre dans les vésicules acides, telles que les lysosomes, où elle est dégradée. Cependant, la quantité internalisée ne correspond qu'à 23 % de la [<sup>125</sup>I]-CyPB initialement fixée, suggérant l'existence d'un second site de fixation non endocyté.

## 2- Internalisation de la CyPB dans les lymphocytes circulants

Nous avons alors vérifié si ce phénomène d'endocytose avait également lieu dans les lymphocytes T circulants. Les lymphocytes ont d'abord été incubés en présence de 50 nM en [<sup>125</sup>I]-CyPB pendant 1 h à 4°C afin de saturer les sites de fixation. Après élimination du ligand non fixé, les cellules ont été incubées soit à 4°C, soit à 37°C afin de provoquer l'endocytose du ligand. Au bout de 60 min, les surnageants d'incubation ont été recueillis et déposés sur colonne G25 PD-10 pour séparer la [<sup>125</sup>I]-CyPB intacte des produits de dégradation radioactifs. Les profils d'élution sont représentés Figure 29. A 37°C, deux fractions de radioactivité sont éluées. Le premier pic correspond à la [<sup>125</sup>I]-CyPB non dégradée et libérée de la membrane cellulaire. Il est également retrouvé à 4°C, reflétant par ailleurs la réversibilité de la fixation. Le second pic plus tardif correspond aux produits de dégradation libérés lors de l'endocytose. Ces résultats démontrent que le phénomène d'internalisation observé avec les cellules Jurkat existe également chez les lymphocytes T circulants.

Nous avons alors recherché l'implication des sites GAG sulfatés et non glycaniques dans le phénomène d'endocytose. Dans un premier temps, nous avons étudié la cinétique d'internalisation de la CyPB. Pour ces expériences, les cellules ont été incubées en présence de 50 nM de [<sup>125</sup>I]-CyPB à 37°C. A différents temps, les cellules ont été prélevées et traitées par différents tampons afin de discriminer les deux sites de fixation : pH4 et NaCl 0,6 M. Lorsque les cellules sont lavées à pH acide, la radioactivité associée aux cellules correspond à la [<sup>125</sup>I]-CyPB internalisée (protégée du lavage acide) et fixée aux sites GAG sulfatés (résistants au lavage acide). L'incubation en présence de protamine permet de bloquer la fixation sur les sites GAG sulfatés et de ne mesurer que le ligand intracellulaire. Ainsi, la différence de radioactivité associée aux cellules en présence ou en absence de protamine correspond à la quantité de [<sup>125</sup>I]-CyPB fixée aux sites GAG sulfatés.

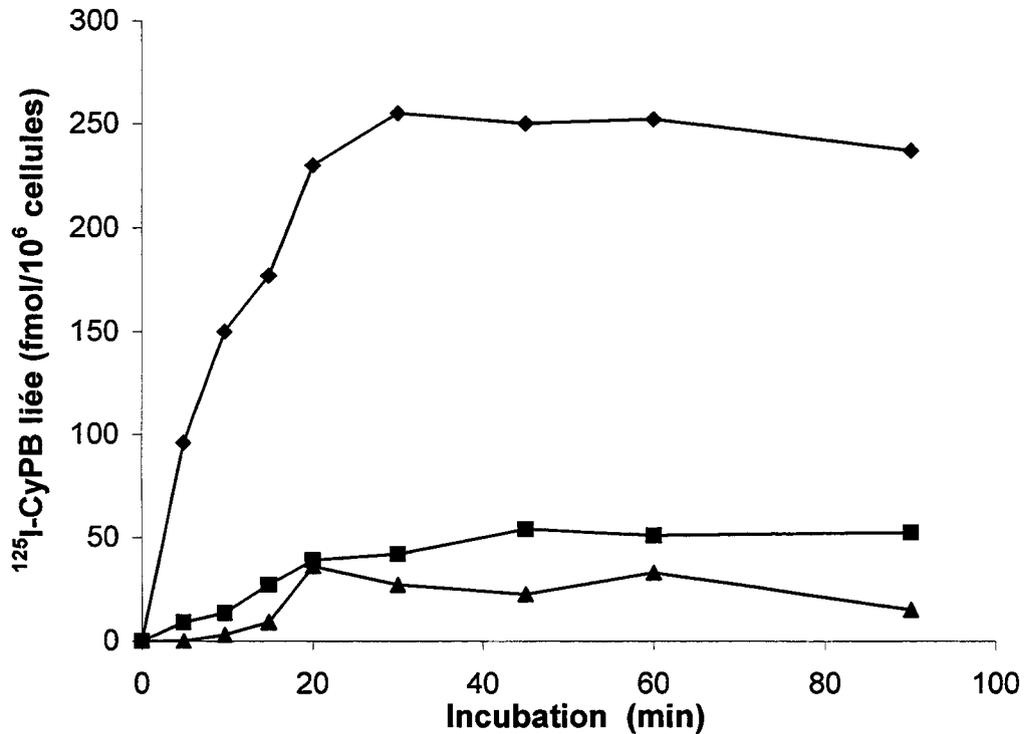


**Figure 29** : Analyse de la radioactivité libérée des lymphocytes après incubation en présence de [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB. Après saturation des sites de fixation membranaires, les cellules ont été mises en suspension à 4°C ou à 37°C. Après 1 h d'incubation, les surnageants sont recueillis et déposés sur colonne de gel-filtration G25. Des fractions de 500  $\mu\text{l}$  sont récoltées puis comptées afin d'analyser la radioactivité libérée.

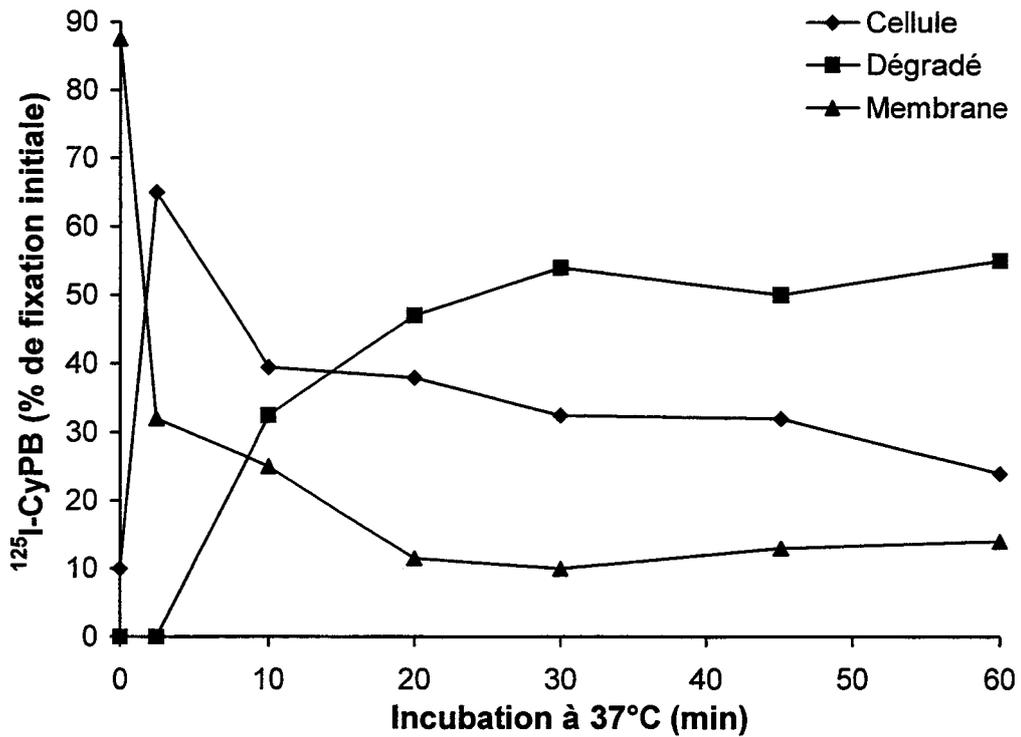
L'exemple représenté (Figure 30) montre une fixation importante sur ces derniers ( $130.000 \pm 6.000$  sites/cellule). L'association de [ $^{125}$ I]-CyPB avec les lymphocytes est rapide et atteint un plateau à partir de 20 min. Par contre, la radioactivité intracellulaire n'apparaît qu'après 10 min d'incubation, ce qui reflète la fixation du ligand avant internalisation, puis atteint un maximum à 20 min. Toutefois, cette endocytose ne représente que  $35 \text{ fmol}/10^6$  cellules contre  $250 \text{ fmol}/10^6$  cellule en absence de protamine. Il est donc peu probable que les sites majoritaires de nature GAG sulfatés soient responsables de l'internalisation du ligand.

Afin de déterminer si les récepteurs non glycaniques sont impliqués dans l'internalisation de la CyPB, les cellules ont été lavées par du PBS-NaCl 0,6 M. Dans ce cas, seule la radioactivité intracellulaire et associée aux sites résistants est mesurée. Dans les 10 premières min, la [ $^{125}$ I]-CyPB se lie progressivement sur les sites résistants au NaCl et atteint un plateau après 20 min. A cet instant, la quantité de ligand résistant au lavage NaCl 0,6 M ( $40 \text{ fmol}/10^6$  cellules) est proche de la quantité de CyPB internalisée déterminée précédemment. Ces résultats suggèrent que la proportion de CyPB endocytée correspond à la partie du ligand fixé aux sites non glycaniques. De plus, la radioactivité associée aux cellules après lavage NaCl 0,6 M reste constante, alors que le taux de [ $^{125}$ I]-CyPB endocytée varie au cours du temps, ce qui suggère que le récepteur endocyté est recyclé à la surface des cellules et fixe à nouveau la CyPB libre.

Pour confirmer l'implication des sites non glycaniques dans l'endocytose, les cellules ont été incubées à  $4^\circ\text{C}$  pendant 1 h jusqu'à saturation des sites de fixation. Après lavage par du PBS-NaCl 0,6 M afin de déplacer la CyPB fixée sur les GAG, les cellules ont été incubées à  $37^\circ\text{C}$  et la distribution de la CyPB sur les sites résistants au NaCl 0,6 M a été analysée à différents temps après lavage acide : associée aux membranes (sensible au lavage acide), internalisée (protégée du lavage acide) et libérée dans le surnageant. Cette dernière fraction a été précipitée par l'ATCA 10% afin de mesurer le ligand dégradé correspondant à la radioactivité non précipitable. Le 100% correspond à la fixation de la [ $^{125}$ I]-CyPB sur les sites non glycaniques à  $4^\circ\text{C}$  (Figure 31). Durant les 3 premières minutes, la fraction liée aux membranes chute rapidement tandis que la fraction de [ $^{125}$ I]-CyPB internalisée augmente simultanément. Après ce délai, la fraction internalisée diminue au profit de la fraction de [ $^{125}$ I]-CyPB dégradée qui apparaît dans le surnageant. Ces résultats démontrent que les sites non glycaniques sont responsables de l'internalisation de la CyPB.



**Figure 30 : Cinétique d'internalisation de la  $[^{125}\text{I}]$ -CyPB dans les lymphocytes.** Les cellules ont été incubées à 37°C avec 50 nM de  $[^{125}\text{I}]$ -CyPB en présence (▲) ou en absence de protamine (◆, ■). Aux temps indiqués, elles sont lavées soit par du tampon PBS-citrate pH4 (◆,▲), soit par du PBS-NaCl 0,6 M (■) afin de discriminer les 2 sites de fixation de la CyPB. Les résultats sont exprimés en quantité de  $[^{125}\text{I}]$ -CyPB associée aux cellules après ces différents traitements.



**Figure 31 : Cinétique d'endocytose de la  $^{125}\text{I}$ -CyPB par les sites non glycaniques.** Les cellules ont été incubées pendant 1 h à 4°C en présence de 50 nM de  $^{125}\text{I}$ -CyPB. Après lavage par du PBS-NaCl 0,6 M afin d'éliminer le ligand fixé sur les sites glycaniques, les cellules ont été incubées à 37°C. Aux temps indiqués, des aliquots sont prélevés et la radioactivité est mesurée dans les milieux d'incubation (■), les surnageants de lavage acide (▲) et les culots cellulaires (◆). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fixation initiale la  $^{125}\text{I}$ -CyPB sur les sites résistants au lavage NaCl 0,6 M.

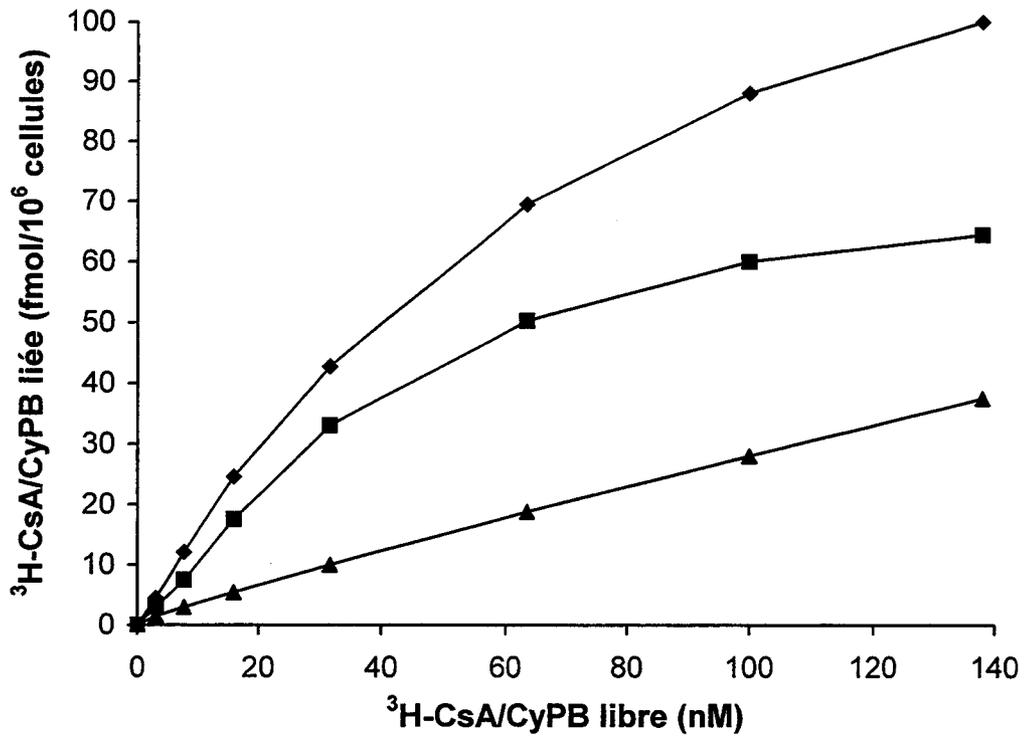
## C- Fixation et endocytose du complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA

Nous avons montré que la CyPB possédait deux domaines de fixation distincts, le premier étant probablement localisé dans le peptide N-terminal et interagissant avec des GAG sulfatés, le second, couvrant le site catalytique de la CyPB et reconnaissant un récepteur non glycanique. Ainsi, lorsque les expériences de fixation sont réalisées en présence de CsA, les interactions entre la CyPB et les sites non glycaniques sont inhibées, étant donné que le site catalytique de la CyPB est occupé. Par contre, le médicament n'a aucun effet sur la fixation de la protéine sur les sites GAG sulfatés. De plus, la CsA ne perturbe pas la capacité de la CyPB à se fixer à l'héparine, ce qui permet la formation d'un complexe ternaire composé d'héparine, de CyPB et de CsA. Ces résultats suggèrent que le complexe CyPB/CsA peut interagir avec les lymphocytes T circulants par l'intermédiaire des GAG sulfatés membranaires.

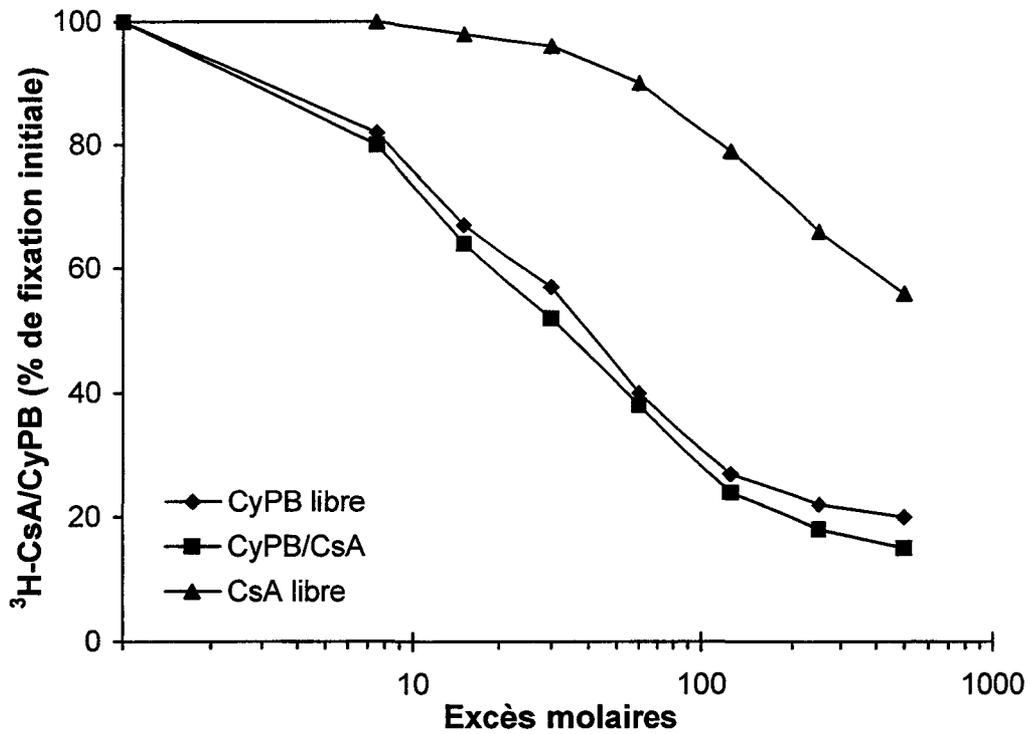
### 1- Fixation du complexe tritié

La capacité de liaison du complexe CyPB/CsA sur les lymphocytes T circulants a été étudiée en utilisant la [<sup>3</sup>H]-CsA. Les cellules ont été incubées pendant 1 h à 4°C en présence de concentrations croissantes en complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA préformé. La fixation non spécifique est obtenue en incubant les cellules en présence de 200 excès molaires en complexe non radioactif. Après soustraction de ce non-spécifique, la fixation spécifique du complexe apparaît dépendante de la concentration et saturable (Figure 32). La linéarisation selon la méthode de Scatchard est compatible avec l'existence d'un site unique présentant une constante d'affinité de  $31 \pm 9$  nM et un nombre de sites estimé à  $40.600 \pm 7.600$ /cellule. Le Kd mesuré est légèrement supérieur à celui obtenu avec la [<sup>125</sup>I]-CyPB. Cette différence peut s'expliquer soit par une sensibilité plus faible liée à l'utilisation d'un dérivé tritié, soit à la dissociation d'une partie du complexe, résultant en une fixation non spécifique de la [<sup>3</sup>H]-CsA sur les membranes. Cependant, les paramètres de fixation sont proches de ceux de la [<sup>125</sup>I]-CyPB sur les sites GAG, suggérant que le complexe CyPB/CsA est bien capable de se fixer à la surface des lymphocytes T.

Afin de confirmer que le complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA se fixe par l'intermédiaire de la CyPB, nous avons étudié les propriétés de la CyPB libre et de la CsA non complexée à inhiber la fixation du complexe à la surface des cellules (Figure 33).



**Figure 32 : Fixation du complexe CyPB/CsA à la surface des lymphocytes.** Les cellules ont été incub es avec les concentrations indiqu es en complexe CyPB/ $^3\text{H}$ -CsA pendant 1 h à 4 C. La fixation spécifique (■) est obtenue après soustraction du non spécifique (▲) de la fixation totale (◆). Les points représentent les valeurs moyennes de triplicate à chaque concentration du ligand.



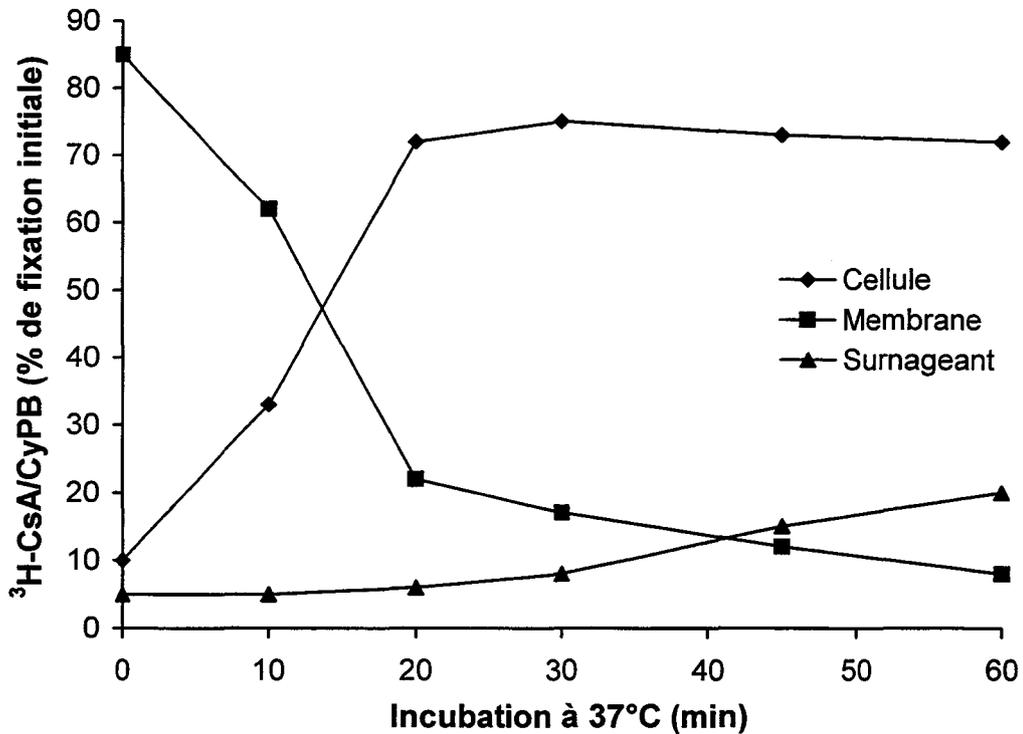
**Figure 33 : Compétition de fixation du complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA.** Les cellules ont été incubées en présence de 50 nM de CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA préformé et plusieurs concentrations en complexe non marqué, en CyPB non complexée ou en CsA libre. Après 1 h d'incubation à 4°C, les cellules ont été lavées et la radioactivité restant associée aux cellules a été mesurée et exprimée en pourcentage par rapport à la fixation totale obtenue en absence d'inhibiteurs.

Le 100% correspond à la fixation du complexe tritié en absence de compétiteurs. La CyPB libre inhibe la fixation du complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA de la même manière que le complexe non marqué, démontrant que les deux ligands reconnaissent les mêmes sites avec des affinités similaires. Par contre, la CsA libre ne déplace que faiblement le complexe tritié. De plus, cette diminution serait plutôt provoquée par la dilution isotopique du complexe tritié en présence de CsA non radioactive, résultant en la fixation d'un complexe non radiomarqué.

## 2- Endocytose du complexe tritié

Précédemment, nous avons montré que la CyPB liée à la surface des lymphocytes était internalisée à 37°C par l'intermédiaire des sites non glycaniques. Par contre, les sites GAG sulfatés ne semblaient pas être impliqués dans ce phénomène. Toutefois, ces derniers, en fixant le complexe CyPB/CsA, pourraient provoquer une séquestration du complexe à la surface du lymphocyte T et faciliter ainsi l'incorporation du médicament après sa dissociation. Afin de vérifier cette voie d'incorporation, les cellules ont été préalablement incubées en présence de 50 nM en CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA pendant 1h à 4°C. Après avoir éliminé l'excès de ligand non fixé, les cellules ont été placées à 37°C et la distribution de la radioactivité associée aux cellules a été analysée aux différents temps indiqués, après lavage Glycine 0,2M / NaCl 0,5 M, pH4, afin d'éliminer le ligand fixé en surface (Figure 34). Durant les premières minutes, la fraction associée aux membranes diminue rapidement alors que la fraction intracellulaire augmente pour atteindre la saturation au bout de 20 min d'incubation. Mais contrairement à la [<sup>125</sup>I]-CyPB qui était libérée dans le milieu sous une forme dégradée, la [<sup>3</sup>H]-CsA s'accumule dans la cellule et aucune radioactivité significative n'est retrouvée dans le surnageant. Ces résultats suggèrent que la CsA est incorporée dans les cellules après la fixation spécifique du complexe CyPB/CsA sur les sites GAG sulfatés. Une fois le complexe fixé à ces récepteurs, la CsA pourrait se dissocier et entrer dans la cellule par simple lipophilie.

Pour confirmer l'implication des sites de fixation de la CyPB dans la fixation du complexe, ces mêmes expériences ont été réalisées avec des lymphocytes traités à la trypsine. En effet, nous avons montré précédemment que la fixation de la [<sup>125</sup>I]-CyPB était éliminée après un tel traitement. Ainsi, ni la fixation du complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA, ni l'incorporation de la CsA ne sont observées, confirmant que le complexe se fixe sur les sites GAG sulfatés et que ces derniers sont nécessaires à l'incorporation du médicament sous sa forme complexée.



**Figure 34 : Cinétique d'endocytose de la CsA complexée à la CyPB dans les lymphocytes.** Les cellules ont été incubées avec 50 nM en complexe CyPB/ $^3\text{H}$ -CsA pendant 1 h à 4°C. Après élimination du ligand non fixé, les cellules ont été incubées à 37°C. Aux temps indiqués, des aliquots sont recueillis, la radioactivité est mesurée dans les surnageants d'incubation, les éluats et les culots cellulaires après lavage acide. Les ordonnées représentent les pourcentages de la radioactivité initialement liée aux cellules, retrouvée dans les cellules (◆), associée aux membranes (■) et libérée dans le milieu d'incubation (▲).

## D- Discussion

Les résultats obtenus dans cette troisième partie mettent en évidence des fonctions différentes associées aux deux types de récepteurs lymphocytaires de la CyPB (Figure 35).

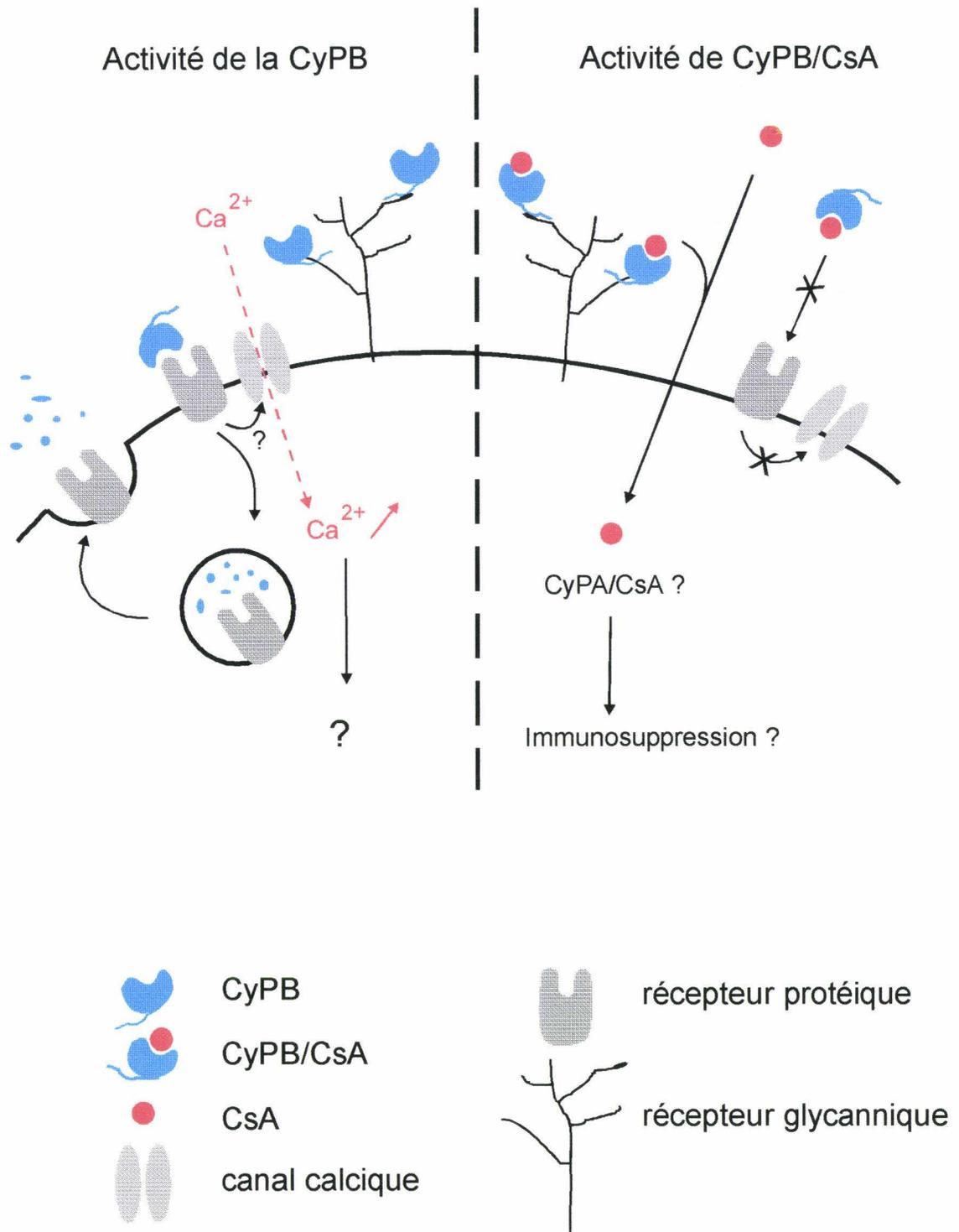
Les sites non glycaniques, de nature protéique, représentent probablement les sites de fixation réels de la protéine puisqu'ils sont nécessaires à la transduction d'un signal intracellulaire et à l'endocytose de la CyPB. En effet, la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes circulants induit un rapide flux calcique, dépendant de la présence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire, mais indépendant de l'activation de la PLC. Par contre, en présence de CsA, l'entrée de  $Ca^{2+}$  est inhibée, suggérant que le site catalytique de la CyPB est nécessaire pour induire ce phénomène. Ainsi, la CyPB induirait un flux calcique, soit en se fixant directement sur un canal membranaire et en contrôlant son ouverture, soit indirectement en se fixant sur un récepteur impliqué dans la régulation d'un canal membranaire associé. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été décrit pour la CyPB intracellulaire. En effet, Bram & Crabtree (1994) ont caractérisé une protéine membranaire du réticulum endoplasmique, la CAML, capable d'interagir avec la CyPB présente dans ce compartiment, et impliquée dans la régulation d'un flux calcique intracellulaire. Cependant, il n'est pas encore clairement défini si la CAML fait office de canal, ou si elle contrôle l'ouverture d'un canal calcique associé. Une telle protéine pourrait être exprimée à la surface des lymphocytes, et correspondre au récepteur non glycanique que nous avons caractérisé. De plus, la capacité à générer un flux calcique n'est pas exclusive à la CyPB. Une autre immunophiline extracellulaire, la FKBP12, possède également cette propriété. En effet, Bang *et al.* (1995) ont montré que la FKBP12 sécrétée par les mastocytes active les neutrophiles et induit un flux calcique intracellulaire. Cependant, un éventuel récepteur membranaire pour la FKBP12 n'a pas été caractérisé.

Les seconds sites, majoritaires et de nature glycanique sulfaté, ne participent ni à l'internalisation du ligand, ni à la transduction du signal. Par contre, en raison de leur nombre important à la surface des lymphocytes, ces sites sulfatés pourraient jouer le rôle de réservoir pour la CyPB. Ils pourraient ainsi réguler son activité au niveau du site protéique, soit en prolongeant son effet au niveau des lymphocytes T, soit en modifiant sa conformation, favorisant ainsi ses interactions avec son récepteur.

Les sites glycaniques pourraient également être impliqués dans le ciblage du complexe CyPB/CsA à la surface des lymphocytes. En effet, la CyPB complexée au médicament conserve ses propriétés de fixation sur ces sites, alors qu'elle ne se lie plus aux sites non

glycanniques. Une fois le complexe fixé à la membrane, la CsA s'accumule dans la cellule. Etant donné que la CyPB liée aux sites GAG sulfatés n'est pas endocytée, le médicament se dissocie probablement du complexe fixé à la surface de la cellule, et pénètre ensuite par simple diffusion. Ainsi, la CsA complexée pourrait être ciblée vers les lymphocytes T exprimant les sites GAG sulfatés et s'accumuler à la surface de ces cellules, ce qui faciliterait son incorporation massive. Etant donné que les lymphocytes fixant la CyPB sont exclusivement des cellules T, et essentiellement des lymphocytes CD4<sup>+</sup>, il est possible que cette voie d'incorporation spécifique intervienne dans la sensibilité de ces cellules à la CsA, et favorise une meilleure activité immunosuppressive.

Cette hypothèse a fait l'objet des travaux présentés dans la quatrième partie.



**Figure 35 : Devenir de la CyPB et du complexe CyPB/CsA dans les lymphocytes T circulants.**

## IV- ROLE DE LA CYPB DANS L'IMMUNOSUPPRESSION

En transplantation d'organes, la sensibilité à la CsA est un point crucial pour le maintien de la greffe. Malgré un suivi attentif, des variations interindividuelles de sensibilité sont souvent observées, aboutissant à des effets toxiques ou à une immunosuppression insuffisante (Klintmalm *et al.*, 1985). Plusieurs études *in vitro* ont montré l'existence de larges variations interindividuelles de la réponse lymphocytaire à la CsA, sans clairement définir les mécanismes cellulaires de cette susceptibilité au médicament. La compréhension de ce phénomène permettrait d'optimiser la traitement immunosuppresseur.

Aux concentrations thérapeutiques, la CsA s'accumule principalement dans les érythrocytes, alors qu'une fraction mineure est associée avec la population lymphocytaire (Lindholm, 1991). La cible intracellulaire de la CsA est principalement la CyPA (Foxwell *et al.*, 1992), mais la CyPB plasmatique (Allain *et al.*, 1995) pourrait intervenir en modifiant la distribution du médicament entre les différents compartiments du sang. Dans les travaux précédents, nous avons montré que la CyPB se fixait à la surface des lymphocytes T sur des sites GAG sulfatés et non glycaniques. En présence de CsA, la protéine perd sa capacité à se fixer sur les sites non glycaniques, alors que le complexe CyPB/CsA se fixe encore sur les sites GAG sulfatés majoritaires. De plus, la CsA complexée à la CyPB est incorporée à 37°C et s'accumule dans la cellule. Ces résultats suggèrent que la CyPB pourrait cibler la CsA vers les lymphocytes par l'intermédiaire de ces sites GAG sulfatés, et par conséquent augmenter la concentration intracellulaire du médicament. Dans cette quatrième partie, nous avons étudié le rôle de la CyPB dans l'activité immunosuppressive de la CsA.

### A- Mesure du taux de CyPB plasmatique chez les patients traités à la CsA

La CyPB a tout d'abord été quantifiée par ELISA dans le plasma de donneurs sains (n = 34). La concentration plasmatique varie de 40 à 215 ng/ml ( $88 \pm 44$  ng/ml). Par la même méthode de dosage, le taux de CyPB a été mesuré dans le plasma de patients transplantés, traités à la CsA (n = 42). La concentration de la CyPB est considérablement augmentée et varie de 65 à 750 ng/ml ( $266 \pm 130$  ng/ml) (Figure 36A). La concentration plasmatique chez ces patients est 3 fois plus élevée que chez les individus sains ( $P < 0,01$ ). Ainsi, le taux de CyPB est augmenté chez les individus traités à la CsA et sujet à de larges variations interindividuelles.

Le taux résiduel de CsA dans le sang de ces patients montre également des variations, de 30 à 900 ng/ml ( $284 \pm 210$  ng/ml) mais aucune corrélation n'existe entre les concentrations en CyPB plasmatique et en CsA ( $r = 0,11$ ). De plus, le classement de ces transplantés en fonction de leur taux résiduel de CsA, faible ( $<200$  ng/ml) ( $n = 19$ ), intermédiaire ( $n = 14$ ) et élevé ( $>400$  ng/ml) ( $n = 9$ ) ne permet pas davantage de mettre en évidence une corrélation entre les taux de CyPB et de CsA au sein de ces trois groupes (respectivement,  $r = -0,4$  ;  $r = 0,21$  ;  $r = 0,51$ ) (Figure 36B). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la concentration plasmatique en CyPB est probablement due au traitement à la CsA, mais que cette augmentation n'est pas quantitativement reliée au taux résiduel de CsA.

L'administration orale de CsA est caractérisée par des variations importantes de la cyclosporinémie pendant les premières heures. Pour déterminer si les variations individuelles de la concentration en CyPB plasmatique sont reliées à ces variations du taux de CsA, nous avons mesuré les cinétiques des variations des taux de la CsA et de la CyPB chez 8 patients transplantés. La concentration en CsA est multipliée par 6 dans les premières heures qui suivent l'ingestion puis retourne lentement au taux de base. La concentration en CyPB plasmatique est également sujette à des variations au cours du temps. Néanmoins, ces variations ne sont pas aussi prononcées que celles du médicament (Figure 37). De plus, aucune relation n'est trouvée entre les cinétiques de la CsA et de la CyPB, suggérant que les variations intra-individuelles de la cyclosporinémie n'ont aucune incidence directe sur le taux de CyPB plasmatique.

Afin de vérifier les dosages de CyPB obtenus par ELISA, nous avons identifié la protéine par Western blot, en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CyPB très spécifiques. Ces anticorps ne sont pas utilisables en ELISA étant donné qu'ils ne reconnaissent pas la forme native de la CyPB. Par contre, ils reconnaissent la forme dénaturée avec une haute sensibilité et ne croisent pas avec les autres isoformes de CyP. La CyPB est bien reconnue dans tous les plasma testés (Figure 38). Bien que la protéine soit détectée en grande quantité chez les transplantés traités à la CsA, l'intensité de marquage n'est pas proportionnelle à la concentration en CsA, confirmant les dosages par ELISA.

Finalement, nous avons mesuré la concentration de la CyPB dans les lymphocytes, cellules directement impliquées dans l'action de la CsA. La concentration en CyPB lymphocytaire est sujette à des variations chez les transplantés traités à la CsA, de 20 à 109 ng/ml ( $59 \pm 36$  ng/ml). Cependant, ces résultats peuvent être fonction du nombre de lymphocytes isolés chez ces patients. Pour vérifier cette possibilité, le taux de CyPB

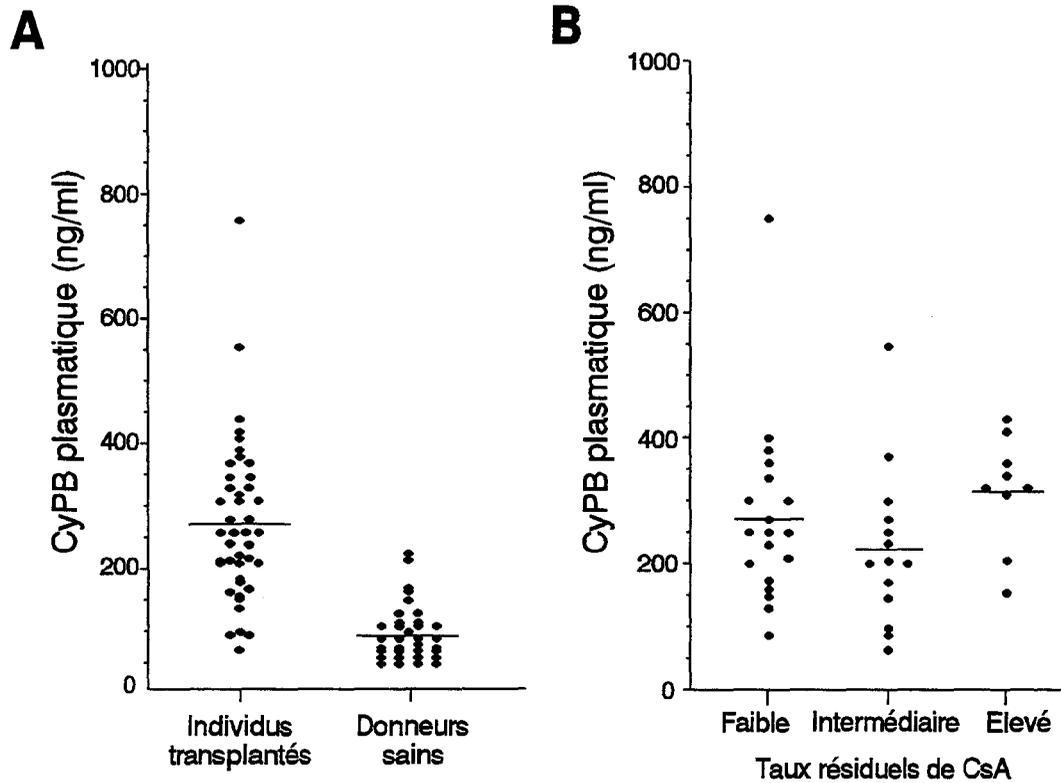
lymphocytaire a été ramené en ng/mg de protéines totales. Dans ce cas, aucune différence significative n'est observée entre les donneurs sains ( $180 \pm 70$  ng/mg de protéine) et les transplantés ( $150 \pm 60$  ng/mg), démontrant que la CsA ne modifie pas le taux de CyPB lymphocytaire.

Pour confirmer que la CsA n'induit pas la sécrétion de la CyPB à partir des lymphocytes, les PBMC d'individus sains ont été incubés en présence de plusieurs concentrations en médicament et la CyPB a été recherchée par ELISA et Western blot. Dans ces conditions, le taux de CyPB intracellulaire reste constant et la protéine sécrétée n'a pas été retrouvée dans le surnageant, démontrant que la CyPB plasmatique a une autre origine.

Ces différentes observations ont également été constatées à partir de patients atteints de PR. La concentration plasmatique en CyPB est de  $348 \pm 259$  ng/ml chez les patients traités à la CsA ( $n = 15$ ) alors que les patients non traités à la CsA ( $n = 5$ ) ont un taux en CyPB équivalent aux individus sains. Ces résultats ont également été confirmés par Western blot.

Le fait que l'augmentation en CyPB plasmatique est observée chez les patients transplantés et chez les patients atteints de PR, suggère que le traitement par la CsA augmente la sécrétion de la CyPB dans le plasma. Ce phénomène n'est cependant pas quantitativement relié à des changements intra-individuels dans la concentration en CsA.

En tenant compte des masses moléculaires de la CyPB (21 kDa) et de la CsA (1,3 kDa), les concentrations en CyPB plasmatique sont respectivement de  $13,1 \pm 6,4$  nM et de  $17,4 \pm 13$  nM chez les patients transplantés et chez les patients atteints de PR, et les taux de CsA sont respectivement de  $236 \pm 175$  nM et de  $92,5 \pm 43$  nM chez les mêmes patients. Etant donné que les CyPs lient la CsA dans un rapport 1/1, et que le médicament est en large excès chez les individus traités, la CyPB est fort probablement présente dans le plasma de ces individus sous une forme complexée. Ainsi, le taux de CyPB/CsA plasmatique chez ces patients serait dans la zone de fixation du complexe sur les sites GAG lymphocytaires, suggérant que la CyPB pourrait cibler le médicament vers les cellules exprimant ces récepteurs.

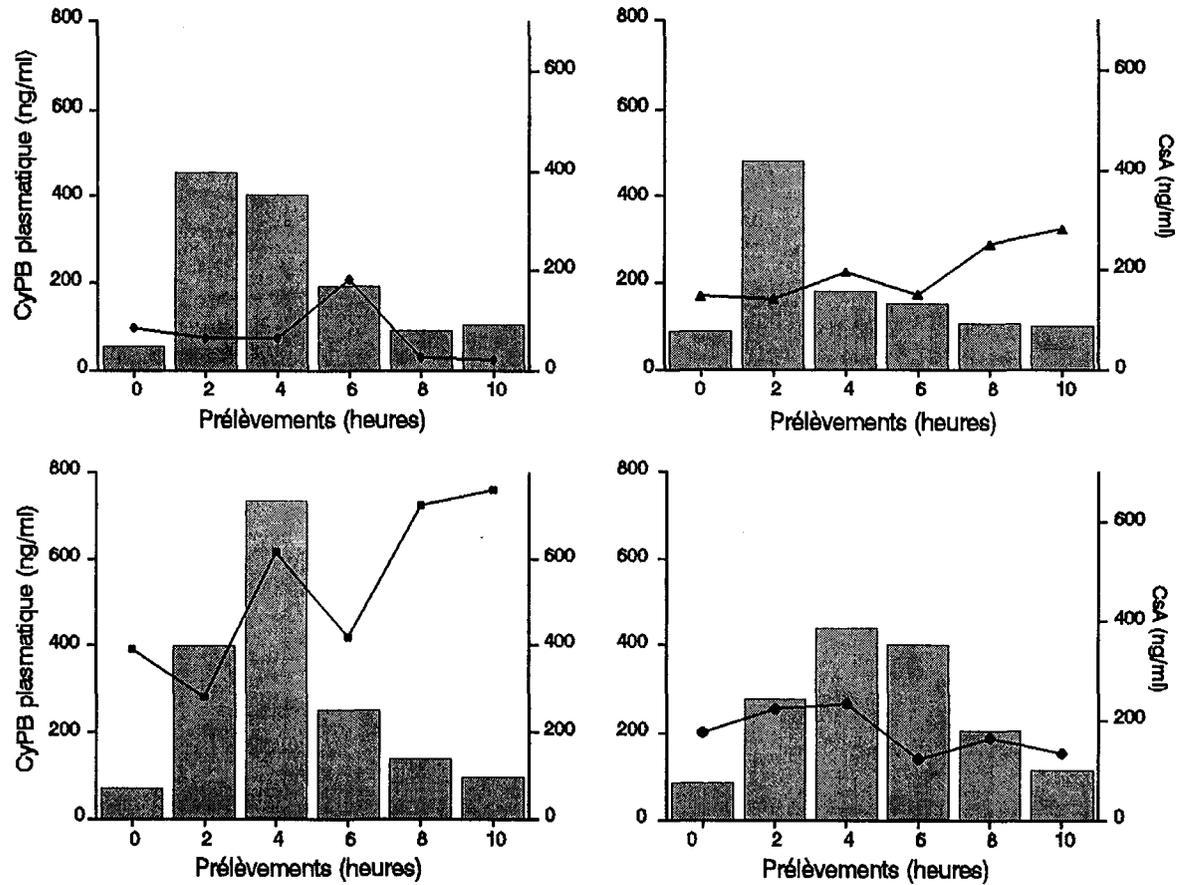


**Figure 36 : Taux individuels de CyPB plasmatique chez les individus sains et les patients transplantés traités à la CsA.**

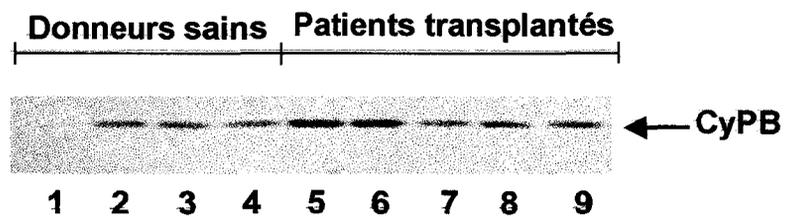
- (A) Comparaison du taux de CyPB plasmatique entre les individus sains (n = 34) et les patients transplantés (n = 42).

- (B) Taux de CyPB plasmatique chez les transplantés classés arbitrairement selon leur taux résiduel en CsA (faible :  $<200$  ng/ml ; intermédiaire :  $200 < CsA < 400$  ng/ml ; élevé :  $>400$  ng/ml).

Les concentrations en CyPB sont déterminées par dosage ELISA. Les valeurs correspondent à la moyenne de triplicate pour chaque échantillon de plasma.



**Figure 37 : Cinétique des variations intra-individuelles des taux de CyPB mesurés dans le plasma de patients transplantés traités à la CsA. Les taux de CyPB (ligne) et de CsA (barre) ont été mesurés respectivement par les méthodes ELISA et EMIT. Les analyses obtenues à partir de 4 individus différents sont représentées.**



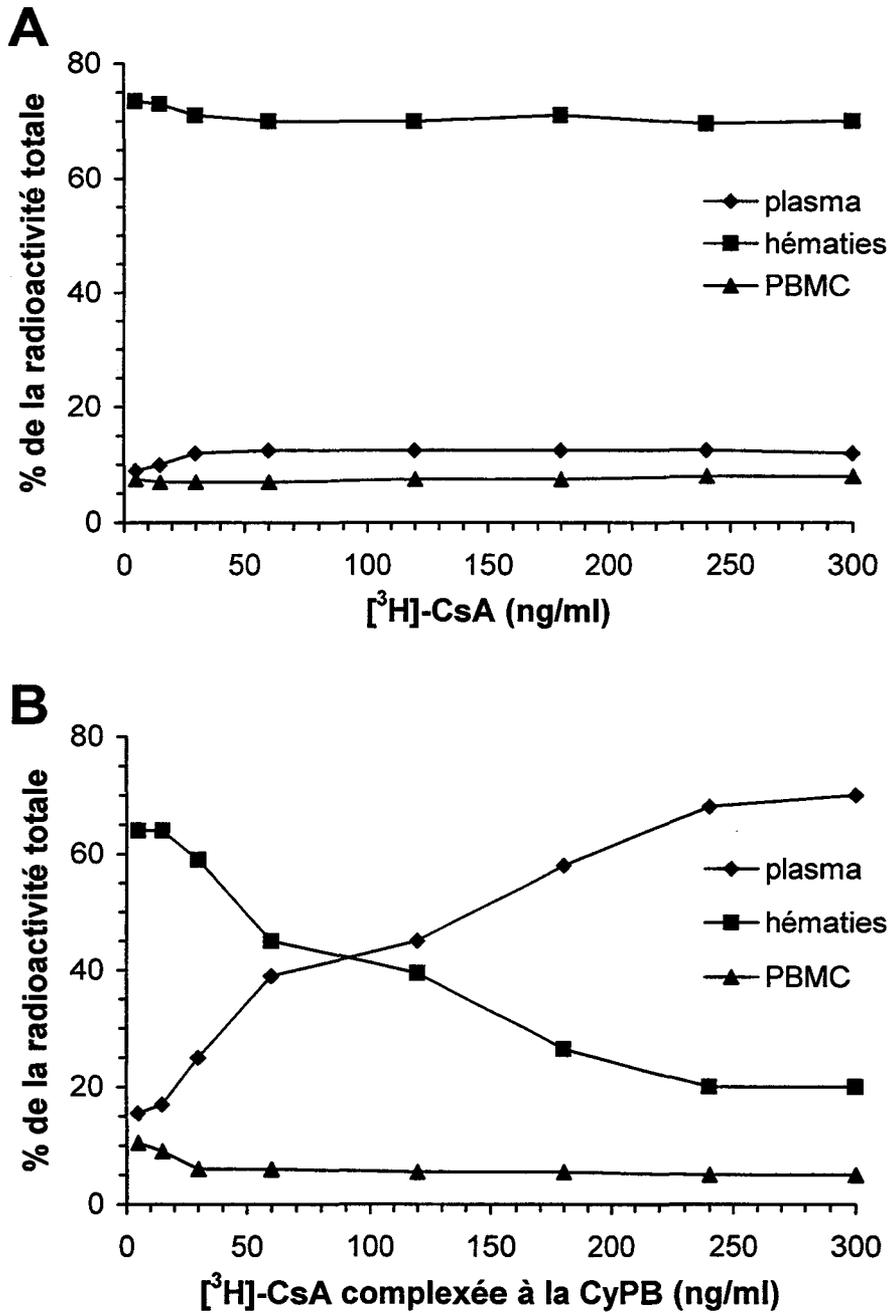
**Figure 38: Immunodétection de CyPB plasmatique d'individus sains et de patients transplantés traités à la CsA.** Après séparation des protéines basiques isolées du plasma par électrophorèse, puis leur électrotransfert sur nitrocellulose, la révélation de la CyPB est réalisée avec un anticorps monoclonal anti-CyPB. Les échantillons analysés proviennent de 4 individus sains (de 1 à 4) et de 5 patients transplantés. Les taux résiduels de CsA chez ces patients sont : patient 5 : >1000 ; 6 : 932 ; 7 : > 1000 ; 8 : 732 ; 9 : 628 ng/ml.

## B- Distribution de la CyPB entre les différents compartiments du sang

### 1- Distribution de la CsA libre et complexée entre les compartiments du sang

Pour déterminer le rôle de la CyPB dans la mise à disposition de la CsA pour les lymphocytes T, nous avons analysé *in vitro* la distribution de la CsA complexée ou non à la CyPB dans les compartiments du sang. Afin d'éviter des variations interindividuelles due à la présence de CyPB endogène ou de lipoprotéines, le plasma a été remplacé par du tampon RPMI-BSA 0,5%. Les échantillons de sang ont été incubés pendant 1 h à 37°C en présence de plusieurs concentrations en [<sup>3</sup>H]-CsA libre ou de complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA préformé. Par la suite, la radioactivité a été mesurée dans les hématies ( $1 \times 10^8$ ), les PBMC ( $1 \times 10^6$ ) et le surnageant (100 µl).

En présence de CsA seule, aucune variation significative n'est observée pour des concentrations comprises entre 7,5 et 300 ng/ml (Figure 39A). Plus de 70% de la radioactivité sont retrouvés associés aux hématies, confirmant que la majorité des protéines fixant la CsA, en particulier la CyPA, sont localisées dans cette population de cellules (Foxwell *et al.*, 1988 ; Allain *et al.*, 1995). La faible rétention de CsA dans le surnageant peut s'expliquer par le remplacement du plasma par du milieu de culture, la CsA plasmatique étant principalement associée aux lipoprotéines (Lindhalm, 1991). A l'opposé, des concentrations croissantes en complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA perturbent la distribution du médicament entre les différents compartiments (Figure 39B). La radioactivité augmente dans le surnageant tandis qu'elle diminue dans les hématies. Des concentrations faibles en CyPB n'empêchent pas l'incorporation du médicament dans les hématies, suggérant que la CsA peut se dissocier du complexe CyPB/CsA et entrer dans ces cellules de manière non spécifique. L'équilibre entre les hématies et le surnageant est rapidement inversé, et de fortes concentrations en CyPB empêchent l'incorporation de la CsA alors retenue dans le surnageant sous forme complexée. En fait, la distribution du médicament entre ces deux compartiments semble être dépendante du rapport entre les protéines érythrocytaires liant la CsA et la CyPB extracellulaire.



**Figure 39 : Influence de la CyPB sur la distribution de la CsA entre les différents compartiments du sang.** Les cellules du sang ont été incubées en présence de plusieurs concentrations en [<sup>3</sup>H]-CsA libre (A) ou complexée à la CyPB (B). Après 1 h d'incubation à 37°C, la radioactivité associée au surnageant (●), aux hématies (▲) et aux PBMC (■) est comptée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de [<sup>3</sup>H]-CsA distribuée par rapport à la radioactivité ajoutée initialement. Les données correspondent à la moyenne de 3 expériences réalisées avec des individus différents.

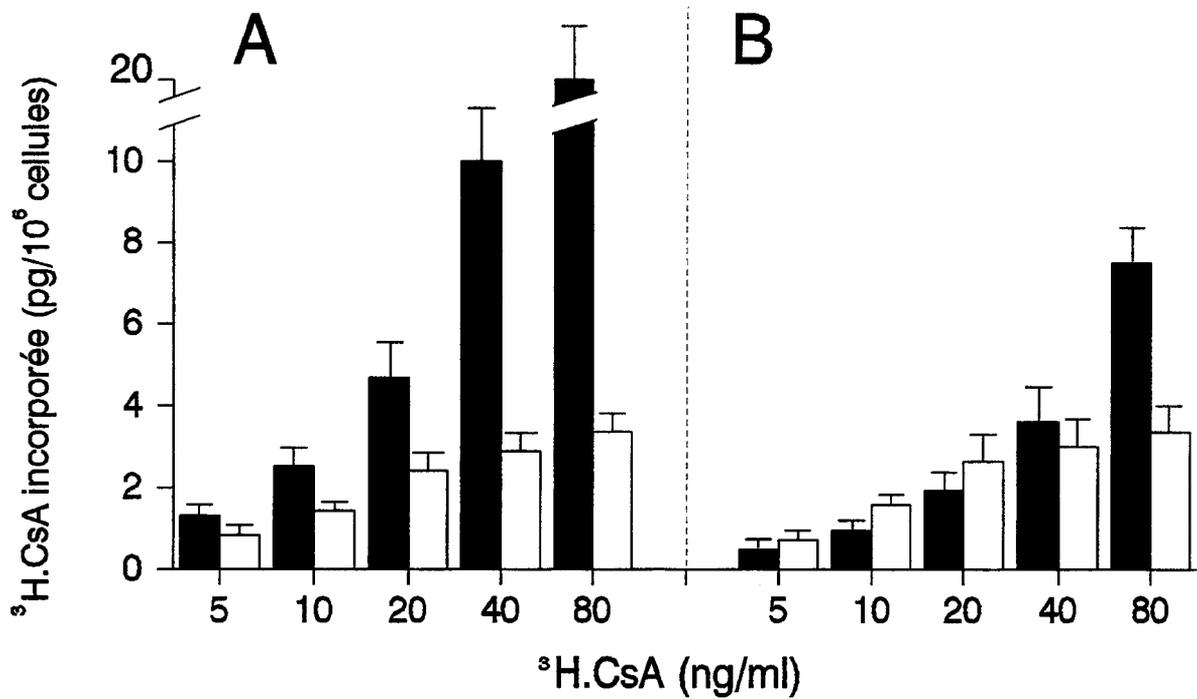
Toutefois, le mécanisme d'incorporation de la CsA dans les PBMC est différent de celui impliqué dans les hématies. A des concentrations inférieures à 30 ng/ml, l'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-CsA complexée est deux fois plus importante dans les PBMC que celle de la [<sup>3</sup>H]-CsA seule, alors qu'à des concentrations plus élevées, la radioactivité associée à ces cellules diminue progressivement. Ce profil suggère que la CyPB favorise une incorporation spécifique et saturable de la CsA dans les PBMC par l'intermédiaire du complexe CyPB/CsA.

## 2- Incorporation de la CsA seule ou complexée dans les PBMC

Nous avons alors comparé l'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-CsA libre ou complexée à la CyPB dans les PBMC isolés (groupe PBMC) ou en présence des autres cellules du sang (groupe UBC). Les incubations ont été réalisées soit directement avec les PBMC préalablement isolés (Figure 40A), soit dans le sang total (Figure 40B). Dans ce dernier cas, la radioactivité associée aux PBMC a été mesurée après isolement de ces dernières.

Dans le groupe PBMC, l'incorporation de la CsA libre est linéaire et correspond à 25% de la radioactivité ajoutée initialement. La saturation de l'incorporation de la CsA n'a lieu dans les PBMC qu'à des concentrations supérieures à 300 ng/ml. Par contre, l'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-CsA complexée est plus faible et saturable dès 40 ng/ml. Il apparaît ainsi que l'incorporation du médicament est limitée par la CyPB, confirmant que la CsA complexée à la protéine est incorporée dans les PBMC par un mécanisme différent.

Dans le groupe UBC, l'incorporation de la CsA libre dans les PBMC est toujours linéaire mais considérablement réduite en comparaison avec celle mesurée dans le groupe PBMC. Seulement 10% de la radioactivité initialement ajoutée sont retrouvés dans les PBMC, ce qui s'explique par une incorporation non spécifique mais de forte capacité dans les autres cellules, en particulier les hématies. L'incorporation du complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA est similaire à celle observée avec le groupe PBMC, démontrant que la présence des hématies n'affecte pas l'incorporation de la CsA complexée dans les PBMC. De plus, pour les faibles concentrations en CsA, l'incorporation de la CsA complexée est supérieure à celle de la CsA libre. Dès 40 ng/ml, elle atteint la saturation et est alors dépassée par l'incorporation de la CsA libre. Ces résultats confirment que ces deux mécanismes d'incorporation sont différents et suggèrent que la CyPB cible la CsA vers les PBMC, favorisant une incorporation spécifique et dépendante de la concentration en complexe CyPB/CsA.



**Figure 40 : Influence de la CyPB sur l'incorporation de la CsA dans les PBMC.** Les cellules des groupes PBMC (A) et UBC (B) ont été incubées en présence de concentrations croissantes en CsA libre (histogramme noir) ou complexée à la CyPB (histogramme blanc). Après 1 h d'incubation à 37°C, les PBMC de chaque groupe sont recueillis et la radioactivité associée aux cellules est comptée. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences.

## C- Rôle de la CyPB dans l'activité immunosuppressive de la CsA

### 1- Activité immunosuppressive du complexe CyPB/CsA

A 37°C, la CsA complexée à la CyPB est incorporée dans les lymphocytes par l'intermédiaire du complexe CyPB/CsA, et s'accumule dans la cellule. Cependant, cette voie d'incorporation pourrait conduire à la rétention du médicament dans un compartiment subcellulaire où elle serait dépourvue de son activité immunosuppressive.

Afin d'infirmar cette hypothèse, les effets du complexe CyPB/CsA et de la CsA libre sur l'activation et la prolifération des lymphocytes ont été comparés. Deux concentrations en CsA ont été utilisées : 25 nM, concentration proche du K<sub>d</sub> de fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T et 250 nM, concentration à la saturation de fixation de la CyPB.

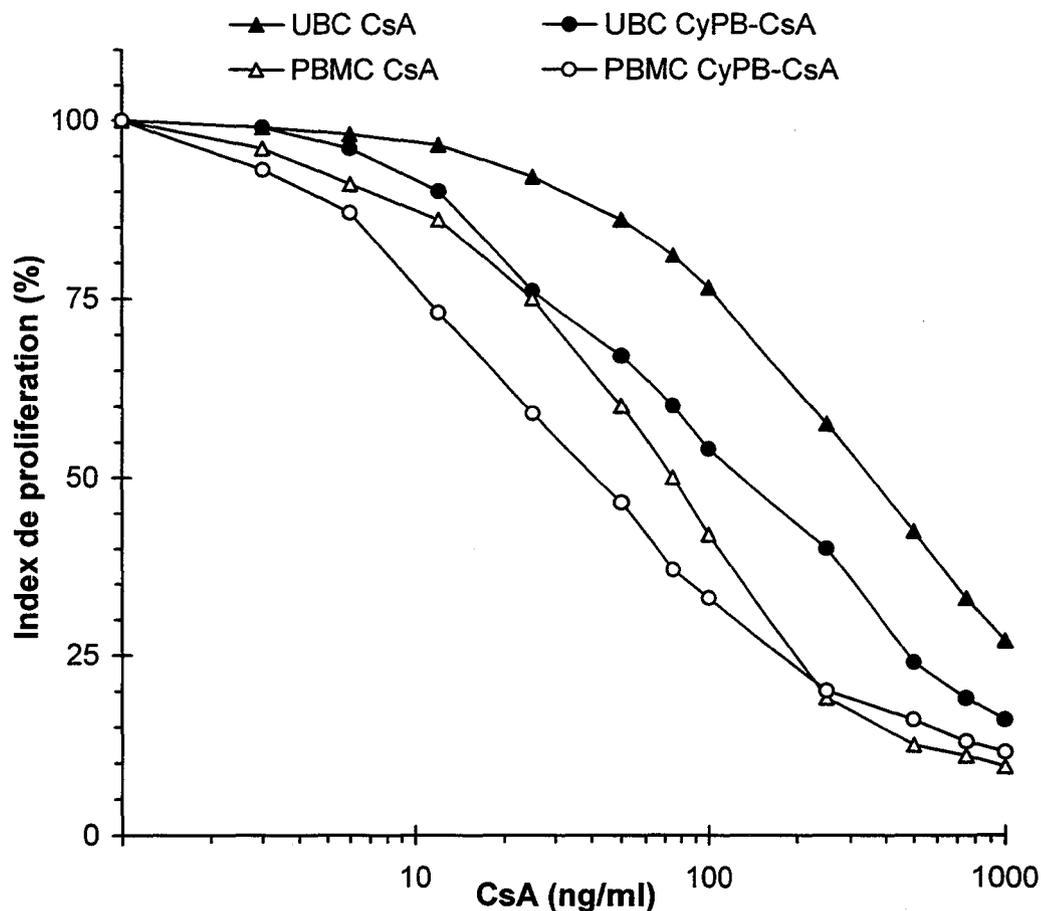
L'activation a été suivie en analysant l'expression du CD25 à l'aide d'un anticorps spécifique par cytofluorimétrie en flux. Le complexe et la CsA inhibent de la même manière l'expression du CD25. Aucun effet significatif n'est observé en présence de CyPB non complexée, démontrant que la protéine seule n'inhibe pas l'activation des lymphocytes T (Tableau XI). Les index de prolifération, analysés à partir des cytogrammes de fluorescence, suggèrent que le complexe CyPB/CsA et la CsA libre inhibent de façon similaire la prolifération des lymphocytes T. Afin de vérifier cette observation, les effets immunosuppresseurs de la CsA libre et complexée ont été analysés en terme d'inhibition d'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans les lymphocytes activés. Ainsi, le complexe CyPB/CsA et la CsA libre inhibent de façon similaire la prolifération des lymphocytes, alors que la CyPB seule est inefficace. Ces résultats démontrent que la CsA complexée à la CyPB conserve les mêmes propriétés immunosuppressives que la CsA seule.

### 2- DI<sub>50</sub> du complexe CyPB/CsA et de la CsA seule dans le sang total et les PBMC isolés

Nous avons alors étudié si la CsA complexée à la CyPB favorisait une meilleure activité immunosuppressive du médicament. Pour cela, nous avons mesuré l'effet de la CsA seule ou complexée sur les PBMC isolés (groupe PBMC) ou en mélange avec les autres cellules du sang (groupe UBC) (Figure 41).

**Tableau XI : Effet de la CyPB sur l'activité immunosuppressive de la CsA.** Les lymphocytes ont été stimulés pendant 72 h par un anticorps anti-CD3, avec soit la CsA, soit le complexe CyPB/CsA ou la CyPB seule (25 et 250 nM). L'activation et la prolifération des cellules T sont visualisées par les variations de fluorescence ( $\Delta$ VMF) associée à l'expression du CD25 et par des expériences d'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine. Les données représentent les pourcentages de la stimulation restante par rapport au contrôle obtenu en absence de CsA et/ou de CyPB. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  S.D. de 3 expériences.

	Expression du CD25 (% $\Delta$ VMF)	Incorporation de [ $^3$ H]-thymidine (%)
Contrôle	100 $\pm$ 9	100 $\pm$ 11
CsA libre		
25 nM	28 $\pm$ 5	45 $\pm$ 9
250 nM	12 $\pm$ 2	21 $\pm$ 4
Complexe CyPB/CsA		
25 nM	26 $\pm$ 2	31 $\pm$ 11
250 nM	12 $\pm$ 1	14 $\pm$ 7
CyPB non complexée		
25 nM	80 $\pm$ 11	95 $\pm$ 16
250 nM	78 $\pm$ 8	98 $\pm$ 7



**Figure 41 : Comparaison des effets anti-prolifératifs de la CsA libre ou complexée à la CyPB sur les lymphocytes activés des groupes PBMC et UBC.** Les échantillons ont été incubés en présence de concentrations croissantes en CsA ou en complexe CyPB/CsA. Après 1 h d'incubation à 37°C, les PBMC sont récupérés, suspendus dans les surnageants d'incubation correspondants et mis en culture pendant 3 jours en présence de 50 ng/ml d'anticorps anti-CD3. Les courbes doses-réponses sont déterminées par incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans les lymphocytes activés. Les données représentent la moyenne de 3 expériences réalisées avec différents donneurs.

Les groupes PBMC et UBC ont été traités avec plusieurs concentrations en complexe CyPB/CsA ou en CsA libre. Après 1h d'incubation à 37°C, les PBMC des deux groupes ont été recueillis puis remis en culture dans les surnageants correspondants en présence d'un anticorps anti-CD3. L'effet immunosuppresseur, analysé en terme d'inhibition d'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine, diffère en fonction de la présence des autres cellules du sang et selon la complexation à la CyPB. En effet, la concentration en CsA libre nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition de prolifération des cellules T est 5 fois plus élevée dans le groupe UBC ( $DI_{50} = 385 \pm 85$  ng/ml) que dans le groupe PBMC ( $DI_{50} = 75 \pm 18$  ng/ml). Cette différence peut s'expliquer par la séquestration de la CsA dans les hématies, comme nous l'avons vu précédemment, d'où une perte importante de l'immunosuppresseur. En présence de CyPB, les  $DI_{50}$  de la CsA complexée sont réduites dans les groupes UBC ( $DI_{50} = 135 \pm 35$  ng/ml) et PBMC ( $DI_{50} = 40 \pm 12$  ng/ml), ce qui démontre que la forme complexée du médicament est plus efficace pour inhiber la prolifération des lymphocytes. De plus, la  $DI_{50}$  du complexe CyPB/CsA est seulement 3,5 fois plus élevée dans le groupe UBC que dans le groupe PBMC, suggérant que la CyPB réduit la perte du médicament dans les hématies. Ces résultats démontrent que la CyPB augmente l'activité immunosuppressive de la CsA en favorisant une meilleure disponibilité du médicament sous une forme complexée.

### 3- Rôle du récepteur de la CyPB dans la sensibilité au complexe CyPB/CsA

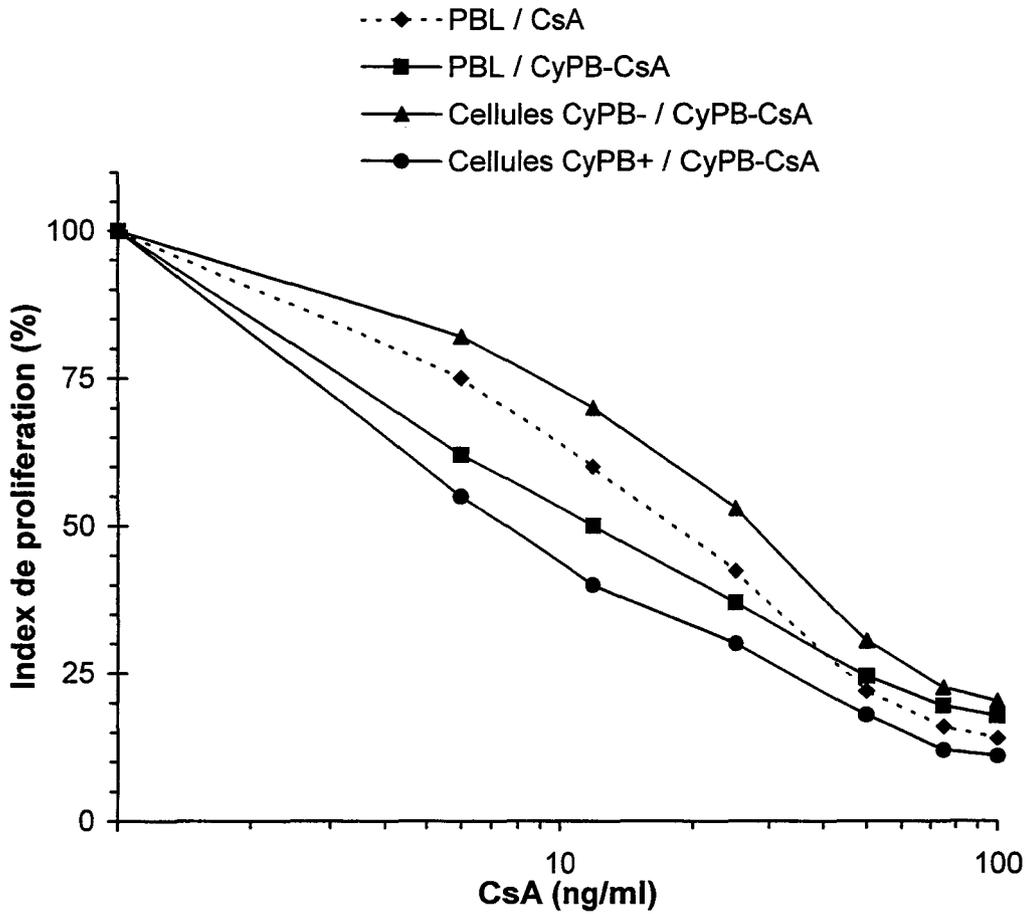
Afin de démontrer l'importance du récepteur de la CyPB dans le ciblage de la CsA complexée, nous avons séparé les lymphocytes en sous-populations fixant ( $CyPB^+$ ) ou non la CyPB ( $CyPB^-$ ). Ces deux sous-populations ont été isolées par affinité sur une colonne de CyPB, la protéine étant couplée spécifiquement à la matrice par son unique résidu de cystéine afin de conserver ses propriétés de fixation. La pureté de ces populations a été contrôlée par cytofluorimétrie en flux en vérifiant la fixation de la CyPB-S-fluorescéine. Ainsi, plus de 95% des cellules retenues sur la colonne lient effectivement le ligand fluorescent, démontrant l'efficacité de la méthode. Les cellules positives  $CyPB^+$  représentent  $30 \pm 10\%$  de la population totale des PBL, et expriment le marqueur CD3. Après activation, les index de prolifération sont respectivement de 2 et 0,56 dans les cellules  $CyPB^+$  et  $CyPB^-$  par rapport à celui mesuré avec les PBL totaux. Ces différences de prolifération peuvent s'expliquer par la répartition des cellules T entre ces deux sous-populations. En effet, l'isolement de ces cellules aboutit à un enrichissement en lymphocytes T dans les cellules positives  $CyPB^+$  et en cellules non-T dans la population cellulaire  $CyPB^-$ . De plus, les valeurs de  $DI_{50}$  mesurées avec les

PBMC dans ce paragraphe sont plus faibles que celles mesurées précédemment. Cette différence peut s'expliquer par la méthode d'activation employée. En effet, les lymphocytes (dépourvus des monocytes) sont activés par des anticorps anti-CD3 adsorbés sur plaque alors que dans les expériences précédentes, l'anticorps anti-CD3 était ajouté en suspension et présenté par les monocytes. Ainsi, les voies secondaires engagées par les monocytes (comme le CD28), peu sensibles à l'immunosuppression, nécessitent des doses plus élevées de CsA. Par contre, le mode d'activation par anti-CD3 seul est très sensible au médicament, expliquant les doses plus faibles pour bloquer la prolifération.

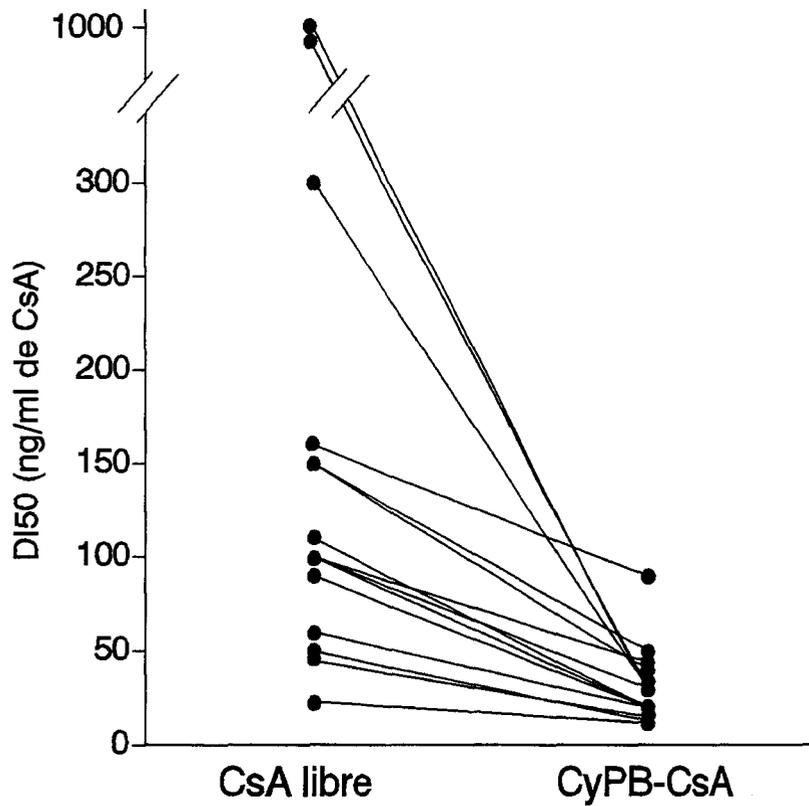
Nous avons alors étudié l'influence de la CyPB sur l'activité immunosuppressive de la CsA dans les deux sous-populations de lymphocytes. Les  $DI_{50}$  du complexe CyPB/CsA sont estimées respectivement à  $7,6 \pm 4$  et  $30,5 \pm 16,2$  ng/ml pour les cellules  $CyPB^+$  et les cellules  $CyPB^-$  (Figure 42), alors qu'elle était intermédiaire à ces deux valeurs pour les lymphocytes totaux. Ceci peut s'expliquer par un enrichissement en cellules sensibles à la CsA dans la sous-population  $CyPB^+$  et par conséquent par un appauvrissement de ces cellules dans la sous-population  $CyPB^-$ . De plus, ces résultats démontrent que la CyPB favorise un ciblage de la CsA vers les cellules fixant le complexe CyPB/CsA. En effet, une fois fixée sur les cellules  $CyPB^+$  sensibles au médicament, la CsA peut être plus facilement incorporée et inhiber la prolifération des lymphocytes avec une meilleure efficacité.

#### 4- Homogénéité de la réponse à la CsA en présence de CyPB

Plusieurs études ont décrit l'existence de larges variations interindividuelles dans la sensibilité à la CsA. Dans ce cadre, les individus ont été classés arbitrairement en bons répondeurs ( $DI_{50} < 200$ ng/ml), répondeurs intermédiaires ( $200$ ng/ml  $< DI_{50} < 400$ ng/ml) et mauvais répondeurs ( $DI_{50} > 400$ ng/ml) (Masy *et al.*, 1994). Cependant, ces investigations ont été réalisées en absence de plasma et donc de CyPB endogène, et n'ont pas tenu compte des modifications de disponibilité du médicament. Nous avons alors analysé l'effet de la CyPB sur la sensibilité à la CsA chez 18 individus sains. Comme attendu, nos individus se répartissent en bons (n=15), intermédiaire (n=1) et mauvais (n=2) répondeurs à la CsA seule, avec des  $DI_{50}$  de 23 à 1000 ng/ml (Figure 43). Mais en présence du complexe CyPB/CsA, les  $DI_{50}$  deviennent toutes inférieures à 100 ng/ml (de 13 à 90 ng/ml), démontrant que l'addition de CyPB résulte en une augmentation de la sensibilité à la CsA ( $P < 0,001$ ).



**Figure 42 : Effet anti-prolifératif du complexe CyPB/CsA sur les cellules CyPB<sup>+</sup> et CyPB<sup>-</sup> activées par anticorps anti-CD3.** Les courbes doses-réponses sont déterminées par incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans les PBMC activés exposés à des concentrations croissantes en CsA, et dans les cellules CyPB<sup>+</sup>, CyPB<sup>-</sup> et PBMC activés exposés à des concentrations en CyPB/CsA. Les données représentent la moyenne de 3 expériences réalisées avec différents donneurs.



**Figure 43 : Influence de la CyPB sur les variations interindividuelles de sensibilité lymphocytaire à la CsA.** L'effet de la CyPB sur l'activité anti-proliférative de la CsA est déterminée par incorporation de [ $^3\text{H}$ ]-thymidine dans les cellules activées exposées à des concentrations croissantes en CsA libre ou complexée à la CyPB. Les  $\text{DI}_{50}$  sont déterminées pour chaque individu à partir des courbes dose-réponse entre la dose en immunosuppresseur et l'inhibition de la prolifération.

Cette amélioration est d'autant plus marquante pour les répondeurs intermédiaires et résistants à la CsA libre, qui deviennent tous sensibles au médicament complexé. Ces résultats suggèrent que les variations interindividuelles de réponse à la CsA seule sont probablement dues à des différences d'incorporation du médicament et supportent l'hypothèse que la CyPB joue un rôle clé dans l'action de la CsA en modifiant sa disponibilité pour les lymphocytes T.

## D- Discussion

La CsA est le médicament le plus couramment utilisé pour la prévention des rejets de greffe et dans le traitement de certaines maladies auto-immunes. Malgré une dose adéquate et un suivi thérapeutique attentif, des effets secondaires toxiques ou une faible immunosuppression peuvent parfois avoir lieu. Ces observations cliniques ont soulevé l'hypothèse qu'il existerait des variations interindividuelles dans la sensibilité à la CsA. En effet, plusieurs études *in vitro* ont confirmé l'existence de larges variations dans la réponse lymphocytaire au médicament (Sander *et al.*, 1986 ; Povlsen *et al.*, 1990 ; Masy *et al.*, 1994). Néanmoins, les relations entre le taux de CsA *in vivo*, les variations de sensibilité observées en clinique et les risques de rejet de la greffe sont complexes et encore incompréhensibles. Cette disparité d'activité peut être liée à la nature hydrophobe de la CsA. *In vivo*, la distribution du médicament est pour beaucoup dépendante de la disponibilité des sites de liaison hydrophobes que sont les hématies, les lipoprotéines et autres protéines plasmatiques (Lindholm, 1991). L'interaction de la CsA avec les hématies ou les lipoprotéines mène à une séquestration du médicament sous une forme inactive, mais d'autres facteurs humoraux, telle que la CyPB plasmatique, pourrait moduler l'activité immunosuppressive de la CsA.

Dans cette quatrième partie, nous avons cherché à vérifier cette hypothèse en déterminant les effets de la CyPB sur la distribution et l'activité de la CsA *in vitro*. La CyPB modifie fortement la distribution du médicament entre les compartiments du sang. Nous avons confirmé que plus de 70% de la CsA libre s'accumulent dans les hématies et aucune saturation n'est observée jusqu'à 300 ng/ml dans les cellules du sang. Ces données sont en accord avec celles d'autres auteurs, qui montrent que la saturation de fixation de la CsA dans les hématies et les PBMC sont obtenues respectivement pour des concentrations supérieures à 1.000 ng/ml et 8.000 ng/ml (Lindholm, 1991). Par contre, l'incorporation de la CsA complexée à la CyPB est rapidement saturable. La distribution de la CsA apparaît donc être dépendante de l'équilibre entre la CyPB extracellulaire et les sites érythrocytaires. Ainsi de fortes

concentrations en CyPB favorisent la rétention du médicament dans le milieu extracellulaire sous une forme complexée. La CsA complexée à la CyPB peut donc entrer dans les cellules du sang soit par une voie non spécifique par un simple échange entre la CyPB extracellulaire et les sites de fixation intracellulaires, soit par une voie spécifique par ciblage du complexe vers les lymphocytes T fixant la CyPB.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la CyPB sur l'activité immunosuppressive de la CsA. Les concentrations de CsA libre ou complexée nécessaires pour inhiber de 50% la prolifération des lymphocytes T isolés sont nettement inférieures à celles observées en présence des autres cellules du sang. Un tel phénomène a déjà été décrit par Batiuk *et al.* (1995), qui ont montré que l'inhibition de l'activité de la calcineurine et de la synthèse d'IFN $\gamma$  par la CsA est plus forte dans les PBMC isolés que dans les mêmes cellules activées en présence des autres constituants du sang. Cette différence semble être due à l'accumulation du médicament dans les hématies, qui représentent les principaux sites de fixation de la CsA dans le sang. Par contre, l'incorporation de la CsA complexée à la CyPB dans les PBMC est peu affectée par la présence des autres cellules. De plus, le complexe CyPB/CsA est plus efficace que la CsA libre pour inhiber la prolifération des lymphocytes T, même en présence des autres cellules du sang, suggérant que l'incorporation facilitée de la CsA résulte en une meilleure réponse immunosuppressive. Enfin, nous avons démontré que la sous-population de lymphocytes T fixant la CyPB est plus sensible à la CsA complexée. Cette population contient essentiellement des lymphocytes CD4<sup>+</sup>, cellules particulièrement sensibles à l'action de la CsA. Il est donc probable que cette augmentation de sensibilité soit due à un ciblage spécifique de la CsA complexée par la CyPB vers cette sous-population de lymphocytes, résultant en une meilleure efficacité du médicament.

Nous avons ensuite analysé l'effet de la CyPB sur les variations de sensibilité lymphocytaire à la CsA. En effet, la réponse *in vitro* de la CsA libre montre de larges variations interindividuelles. Cette variabilité avait été largement étudiée auparavant, mais sans apporter d'explications satisfaisantes sur les mécanismes impliqués. Dans nos expériences, la CsA complexée est plus efficace que la forme libre, et la large variabilité interindividuelle de sensibilité observée avec cette dernière est considérablement réduite en présence du complexe. En effet, tous les individus acquièrent un phénotype sensible lorsque la CsA libre est remplacée par la forme complexée, suggérant que la présence de CyPB empêche les phénomènes de résistance lymphocytaire au médicament. Il semble donc que les mesures *in vitro* de l'activité immunosuppressive de la CsA, réalisées en absence de plasma et donc de

CyPB endogène, donnaient une mauvaise estimation de l'immunosuppression, puisqu'elles ne prenaient pas en compte l'effet bénéfique de la CyPB dans l'incorporation du médicament.

Ainsi, nous avons montré que la CyPB, en fixant la CsA, permet une meilleure incorporation du médicament dans les lymphocytes T, et par conséquent, améliore sa disponibilité et son activité immunosuppressive *in vitro*. Dans ce contexte, nous avons mesuré la concentration de CyPB plasmatique dans le plasma de patients traités à la CsA, transplantés ou atteints de PR, et montré que la protéine y était présente à des concentrations supérieures à celles mesurées dans le plasma d'individus sains. De plus, la CsA étant en large excès, toute la CyPB est probablement complexée au médicament. Chez ces patients, le complexe CyPB/CsA circulant serait alors présent aux concentrations permettant une meilleure efficacité du médicament. Il devrait permettre le ciblage de la CsA vers les lymphocytes T, augmenter son incorporation et favoriser son activité immunosuppressive. Ainsi, l'ensemble de ces résultats supportent l'hypothèse que la CyPB plasmatique pourrait jouer un rôle important dans l'immunosuppression et contribuer au maintien de la greffe.

## *Conclusion générale*

---

Depuis la découverte de la CyPA comme récepteur cytosolique de la CsA (Handschumacher *et al.*, 1994), et la mise en évidence de son identité avec la PPIase de 18 kDa (Fischer *et al.*, 1989 ; Takahashi *et al.*, 1989), les études sur les propriétés des CyPs ont pris un essor considérable. Parallèlement à ces travaux, une nouvelle famille de protéines, possédant la même activité enzymatique mais de structure très différente, a été caractérisée. Ces nouvelles PPIases, dénommées FK506-binding protein (FKBP) (Siekierka *et al.*, 1989a et b), interagissent avec les immunosuppresseurs FK506 et rapamycine. Ces deux familles de protéines ont été réunies sous le terme plus général d'immunophilines (Schreiber, 1991).

Les efforts entrepris pour comprendre les modes d'action des immunosuppresseurs ont permis de mettre en évidence les rôles clés de certains facteurs dans les mécanismes d'activation et de prolifération du lymphocyte T. Ainsi, la calcineurine, cible prioritaire des complexes CyPA/CsA et FKBP12/FK506, a été identifiée comme étant un facteur essentiel dans la voie  $Ca^{2+}$ -dépendante de l'activation du lymphocyte. De même, le NF-AT a été caractérisé comme étant le substrat essentiel de la calcineurine, et le facteur de transcription prédominant dans l'activation des gènes de nombreuses cytokines (Schreiber & Crabtree, 1992 ; Jain *et al.*, 1993). La recherche des cibles de complexe FKBP12/rapamycine a permis d'identifier une nouvelle protéine à activité phosphatidylinositol-4 kinase. Cette enzyme, dénommée TOR, FRAP ou RAFT selon les auteurs, est une étape indispensable à l'entrée du lymphocyte en phase de prolifération (Cardenas *et al.*, 1994 ; Sabatini *et al.*, 1995).

Les fonctions biologiques associées aux différentes isoformes d'immunophilines ont fait l'objet de nombreuses études. Cependant, bien que l'isomérisation de la liaison Xaa-Pro soit une étape limitante dans le repliement des protéines et que les PPIases soient capables d'accélérer cette isomérisation *in vitro*, l'implication de ces enzymes dans la mise en conformation des protéines n'est pas clairement démontrée *in vivo*. Par contre, de nombreuses autres fonctions ont été associées à certaines isoformes, souvent en relation avec des molécules cibles. Ainsi, les immunophilines interagissent avec de nombreuses protéines transmembranaires ou cytosoliques, telles que les canaux calciques (R-IP3, RyR) (Marks, 1996), le récepteur du TGF $\beta$  (Wang *et al.*, 1994), les rhodopsines (Stamnes *et al.*, 1991), le pore ADP/ $Ca^{2+}$ -dépendant de la mitochondrie (Connern & Halestrap, 1994), les récepteurs des stéroïdes (Rataczak *et al.*, 1993 ; Radanyl *et al.*, 1994), des récepteurs plus spécifiques, tels que la CAML (Bram & Crabtree, 1994) et la CyCAP (Friedman *et al.*, 1993), et même les acides nucléiques (Montague *et al.*, 1994 ; Mi *et al.*, 1996). Elles seraient alors impliquées dans la régulation l'activité de ces molécules, notamment au niveau de l'ouverture des canaux,

et auraient une possible activité nucléasique. Une telle disparité fonctionnelle impose que les immunophilines soient représentées dans la majorité des compartiments subcellulaires par de nombreuses isoformes, quelquefois à des concentrations très élevées.

A l'opposé, les données sur les immunophilines sécrétées et leurs fonctions éventuelles sont rares. Ainsi, la FKBP12 et la CyPA auraient une activité chimiotactile pour les granulocytes et les monocytes (Leiva & Lyttle, 1992 ; Xu *et al.*, 1992 ; Sherry *et al.*, 1992), mais aucun récepteur membranaire associé à cette activité n'a été caractérisé. Chez l'Homme, seules trois immunophilines ont été caractérisées dans les liquides extracellulaires. Bien que dépourvues de peptide signal permettant leur passage dans la voie de sécrétion, la CyPA a été identifiée dans les liquides synoviaux (Billich *et al.*, 1997), et la FKBP12 est sécrétée par les mastocytes (Bang *et al.*, 1995) et retrouvée dans le plasma (Shirakata *et al.*, 1995). Cette dernière protéine est d'ailleurs capable d'activer les neutrophiles en induisant un flux calcique, et l'augmentation de sa concentration plasmatique serait à l'origine de phénomènes de résistance au FK506. D'abord décrite comme une protéine résidente du réticulum endoplasmique, la CyPB a été caractérisée dans les milieux de sécrétion tels que le lait et le plasma (Spik *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995). Cette localisation extracellulaire suggérait qu'elle puisse interagir avec des cellules circulantes et/ou interférer dans la disponibilité de la CsA. Afin de vérifier ces hypothèses, nous nous sommes intéressée aux interactions éventuelles de la CyPB avec les lymphocytes, cellules cibles de l'immunosuppression, et nous avons recherché son rôle possible dans l'activité de la CsA.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé des sites de fixation membranaires pour la CyPB à la surface de cellules de lignées T lymphoblastiques. Ces sites, estimés à  $3 \cdot 10^4$  par cellule, permettent une endocytose partielle du ligand (Allain *et al.*, 1994) et reconnaissent, du moins en partie, la région N-terminale de la protéine (Mariller *et al.*, 1996b). Nous avons alors étudié la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes circulants. Bien que les sites de fixation soient uniquement associés à une sous-population des lymphocytes T, essentiellement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, leur expression n'a pas pu être localisée à un phénotype lymphocytaire T bien caractérisé (Denys *et al.*, 1997). Si l'affinité reste similaire à celle mesurée pour les lignées T ( $10^{-8}$  M), par contre, le nombre de sites exprimés à la surface des lymphocytes circulants est très variable. De plus, leur expression serait fonction de l'état d'activation des lymphocytes T, mais pas de leur stade de maturation.

Nous avons ensuite étudié la nature des sites de fixation de la CyPB. En effet, la CyPB possède dans son extrémité N-terminale une région basique susceptible d'interagir avec

l'héparine et d'éventuels GAG sulfatés exprimés à la surface des cellules. De plus, le domaine catalytique des CyPs a souvent été décrit dans la littérature comme intervenant dans des interactions avec des protéines cibles. Nous avons réussi à identifier deux types de sites de fixation, l'un de nature glycanique sulfatée et l'autre de nature protéique, interagissant respectivement avec la région N-terminale et le domaine contenant le site catalytique. Bien que de nature différente, ils présentent des affinités similaires pour la CyPB.

Les sites de nature protéique sont minoritaires et représentent moins de 30 % de la fixation totale. Ces interactions feraient intervenir le domaine conservé des CyPs comprenant les sites enzymatique et de fixation de la CsA, puisque la fixation de la CyPB sur ces sites est inhibée en présence de CsA, et déplacée par la CyPC.

S'il est clairement démontré que la fixation de la CsA bloque le site catalytique et inhibe par conséquent l'activité enzymatique des CyPs, par contre, des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de séparer les deux sites impliqués dans ces fonctions (Zydowsky *et al.*, 1992). Cette distinction est d'ailleurs observée dans l'interaction entre la CyPC et la CyCAP. En effet, la fixation de cette isoforme sur son récepteur est inhibée en présence de CsA. Cependant, ni la CyPA, ni la CyPB, n'entrent en compétition avec la CyPC, démontrant que le site catalytique, conservé entre ces trois isoformes de CyPs, n'est pas impliqué (Friedman *et al.*, 1993). Il semble donc que le site de fixation de la CsA recouvre, du moins en partie, le domaine de reconnaissance de la CyPC pour son récepteur. A l'opposé, les interactions entre la CyPA et la protéine Gag p55 de virus HIV-1 nécessite l'intervention du site catalytique. En effet, si la CsA inhibe la fixation de la CyPA sur cette protéine, par contre, des mutations affectant la fixation du médicament mais conservant l'activité PPIase, n'empêchent pas les interactions (Dorfman *et al.*, 1997). De plus, la région de la protéine Gag reconnue par la CyPA contient une séquence riche en résidu proline, confirmant l'implication du site catalytique (Franke *et al.*, 1994). Afin de savoir si la reconnaissance entre la CyPB et son récepteur lymphocytaire protéique implique directement le site catalytique de l'enzyme, ou une région commune avec le site de fixation de la CsA, des expériences de fixation avec des protéines modifiées par mutagenèse dirigée sont actuellement réalisées au Laboratoire. Ces mutants, modifiés ponctuellement au niveau des sites enzymatique et de fixation de la CsA, devraient permettre de mieux localiser le site d'interaction de la CyPB.

Au niveau du réticulum endoplasmique, la CyPB associée à la CAML intervient dans la régulation d'un flux calcique. De plus, la FKBP12 est associée à la partie cytosolique des canaux calciques RyR et IP3-R, et sa forme extracellulaire est capable de générer un signal

calcique chez les neutrophiles. Sur la base de ces travaux, nous avons étudié les propriétés du récepteur protéique dans le devenir de la CyPB, en nous intéressant plus particulièrement à la transduction d'éventuels signaux calciques et aux mécanismes d'internalisation de la protéine. Ainsi, la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes circulants induit un rapide flux calcique, dépendant de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, mais indépendant de l'activation de la PLC. Par contre, en présence de CsA, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  est inhibée, suggérant que ce phénomène dépend de la fixation de la CyPB sur son récepteur protéique. Ainsi, la CyPB induirait un flux calcique, soit en se fixant directement sur un canal membranaire et en contrôlant son ouverture, soit indirectement en se fixant sur un récepteur impliqué dans la régulation d'un canal membranaire associé. Ce phénomène est à rapprocher des interactions entre la CyPB intracellulaire et la CAML. En effet, il n'est pas encore clairement défini si ce récepteur intracellulaire fait office de canal, ou si il contrôle l'ouverture d'un canal calcique associé. Une telle protéine pourrait être exprimée à la surface des lymphocytes, et représenter le récepteur membranaire de la CyPB. De plus, ces sites protéiques sont également impliqués dans l'endocytose de la CyPB. Une fois la protéine internalisée, elle est dégradée dans la cellule, permettant le recyclage du récepteur à la surface sous une forme libre et active.

Les seconds sites de fixation de la CyPB, de nature glycanique sulfatée, pourraient correspondre à des motifs de type GAG sulfatés. En effet, la CyPB interagit avec l'héparine, et ses interactions sont sensibles à des concentrations en NaCl comprises entre 0,6 et 1 M. De plus, les cellules traitées par les mêmes solutions en NaCl libèrent plus de 50% de la CyPB fixée. La fixation de la CyPB à la surface des cellules est inhibée par l'addition d'héparine, mais faiblement par l'HS et les CS, et fortement diminuée après traitement des cellules à l'héparinase. Par contre, la chondroitinase affecte peu cette fixation. Enfin, la fixation de la CyPB sur ces sites glycaniques est inhibée par la Lf et la protamine, toutes deux étant des heparin binding protein (HBP). La région de la CyPB interagissant avec ces sites est localisée dans son extrémité N-terminale spécifique. Or, cette région contient la séquence  $^1\text{DEKKGPK}^8$ , qui est similaire aux séquences consensus impliquées dans la reconnaissance entre les HBP et les GAG sulfatés (Cardin & Weintraub, 1989). Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que la CyPB pourrait se comporter comme une HBP et se lier à un GAG sulfaté de structure proche de l'héparine et présent à la surface des lymphocytes circulants.

Ces sites glycaniques sont largement majoritaires par rapport aux récepteurs protéiques et sont responsables de l'hétérogénéité de fixation. En effet, leur expression est très variable selon les individus, et ils se distribuent entre les différentes sous-populations lymphocytaires

T, avec une préférence pour les cellules CD4<sup>+</sup>. De plus, la baisse de fixation observée après activation est en majeure partie associée à la diminution de ces sites, suggérant une modification de leur expression, voire de leur structure. En effet, plusieurs auteurs ont montré que la nature et les proportions des différents GAG synthétisés par les lymphocytes sont altérées lors de la stimulation (Hart, 1982 ; Wilson & Rider, 1991 ; Bartold *et al.*, 1989). Ainsi, les motifs *heparin-like* pourraient diminuer au profit d'autres GAG moins sulfatés, non affines pour la CyPB.

La structure des motifs glycaniques reconnus par la CyPB semble être très spécifique à cette protéine, puisque seule une sous-population des lymphocytes T, et majoritairement des cellules CD4<sup>+</sup>, fixent la CyPB avec une telle affinité. En effet, des travaux entrepris au Laboratoire montrent que la CyPB interagit également avec des GAG sulfatés exprimés à la surface d'autres cellules non lymphoïdes, mais avec une affinité nettement inférieure ( $10^{-6}$  M). Cette différence de spécificité pourrait s'expliquer par la large variabilité structurale au sein même de la famille des HS, essentiellement au niveau du nombre et de la position des sulfates (Gallagher *et al.*, 1992). De plus, la fixation membranaire de la CyPB est abolie après protéolyse ménagée, suggérant que, outre les sites protéiques, les sites glycaniques seraient associés aux cellules par l'intermédiaire d'une protéine transmembranaire. Ces sites glycaniques pourraient être portés par des protéoglycannes du lymphocyte, tels que le CD44, ou associés à la membrane par l'intermédiaire des récepteurs lymphocytaires de l'héparine (Bradbury & Parish, 1989). Une autre famille de glycanes seraient également susceptible d'interagir avec la CyPB. En effet, il a été récemment démontré que les sélectines, connues pour fixer spécifiquement les motifs glycaniques de type sulfo- et s-Le<sup>X</sup>, étaient également capables d'interagir avec des structures GAG sulfatés (Green *et al.*, 1995). Etant donné que ces structures Le<sup>X</sup> sont représentées à la surface des lymphocytes T, elles pourraient également correspondre à des ligands potentiels de la CyPB. La purification et la détermination de la structure des motifs glycaniques reconnus par la CyPB permettront de les identifier à l'une ou l'autre famille. Couplées à des travaux de modélisation moléculaire, ces études devraient permettre d'expliquer la spécificité de reconnaissance de la CyPB, et d'apporter, le cas échéant, de nouvelles données sur les propriétés des GAG sulfatés exprimés à la surface des lymphocytes T.

Contrairement au récepteur protéique, les sites glycaniques sulfatés, ne participent ni à l'internalisation de la CyPB, ni à la transduction du signal calcique. Par contre, ils fixent le complexe CyPB/CsA et pourraient intervenir dans le ciblage de la CsA complexée, en

favorisant la concentration du médicament à la surface des lymphocyte T. Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes intéressée aux rôles de la CyPB et de ses sites glycaniques dans l'incorporation et l'activité de la CsA.

Une fois le complexe fixé à la membrane, la CsA s'accumule dans la cellule. Etant donné que la CyPB liée aux sites glycaniques n'est pas endocytée, le médicament se dissocie probablement du complexe fixé à la surface de la cellule, et pénètre ensuite par simple diffusion. Chez un même individu, la population lymphocytaire est hétérogène du point de vue de l'état de maturation et des fonctions associées à chaque sous-population. Cette hétérogénéité est également observée dans les phénomènes de variation de sensibilité cellulaire à la CsA. En effet, l'immunosuppression repose essentiellement sur l'inhibition de l'activation des lymphocytes T auxiliaires. Ces cellules jouent un rôle crucial dans le contrôle de la réponse immunitaire, notamment en synthétisant de nombreuses lymphokines. Malgré un suivi attentif, les variations de sensibilité à la CsA aboutissent souvent à des effets toxiques ou à une immunosuppression insuffisante (Klintmalm *et al.*, 1985). *In vivo*, la distribution du médicament est pour beaucoup dépendante de sa disponibilité. Or, l'interaction de la CsA avec les hématies et les lipoprotéines mène à une séquestration du médicament sous une forme inactive (Lindholm, 1991). Nous avons alors vérifié que la distribution de la CsA entre les compartiments du sang est largement dépendante *in vitro* de la concentration en CyPB. De plus, la CsA est incorporée spécifiquement dans les lymphocytes en présence des autres cellules du sang par un ciblage du complexe CyPB/CsA. Ainsi, en se fixant essentiellement à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et en facilitant l'incorporation de la CsA, la CyPB pourrait favoriser une meilleure activité immunosuppressive.

Nous avons alors analysé l'effet de la CyPB sur les variations de sensibilité lymphocytaire à la CsA. Les concentrations de CsA libre ou complexée nécessaires pour inhiber de 50% la prolifération des lymphocytes T isolés sont nettement inférieures à celles observées en présence des autres cellules du sang. Un tel phénomène a déjà été décrit pour l'effet de la CsA sur l'activation de la calcineurine (Batiuk *et al.*, 1995). Cette diminution d'activité reflète bien la séquestration du médicament sous forme inactive dans les hématies. Par contre, le complexe CyPB/CsA est plus efficace que la CsA libre pour inhiber la prolifération des lymphocytes T, même en présence des autres cellules du sang. De plus, la sous-population de lymphocytes T fixant la CyPB est nettement plus sensible à la CsA complexée. Etant donné que cette population contient essentiellement des lymphocytes CD4<sup>+</sup>,

il est probable que cette augmentation de sensibilité soit due au ciblage de la CsA complexée, et qu'il en résulte une meilleure efficacité du médicament.

Plusieurs études *in vitro* ont montré l'existence de larges variations inter-individuelles de réponse lymphocytaire à la CsA, sans clairement définir les mécanismes cellulaires de cette susceptibilité au médicament (Sander *et al.*, 1989 ; Povlsen *et al.*, 1990 ; Masy *et al.*, 1994). Dans nos expériences, la CsA complexée est plus efficace que la forme libre, et la large variabilité inter-individuelle de sensibilité au médicament est réduite en présence de CyPB. En effet, tous les individus acquièrent un phénotype sensible lorsque la CsA libre est remplacée par la forme complexée, suggérant que la présence de CyPB empêche les phénomènes de résistance lymphocytaire au médicament.

Ainsi, nous avons montré que la CyPB, en fixant la CsA, permet une meilleure incorporation du médicament dans les lymphocytes T, et par conséquent, améliore sa disponibilité et son activité immunosuppressive *in vitro*. Afin de savoir si cet effet bénéfique pouvait avoir lieu *in vivo*, nous avons mesuré la concentration de CyPB plasmatique dans le plasma de patients traités à la CsA. La protéine est présente à des concentrations supérieures à celles mesurées dans le plasma d'individus sains, et existe probablement sous forme complexée. Chez ces patients, le complexe CyPB/CsA circulant serait alors présent à des concentrations favorables à sa fixation, et devrait permettre le ciblage de la CsA vers les lymphocytes T.

L'ensemble de ces résultats supportent donc l'hypothèse que la CyPB plasmatique pourrait contribuer à une meilleure immunosuppression. Par contre, un tel rôle bénéfique n'est pas retrouvé dans le cas de la FKBP12 plasmatique. Cette protéine aurait même l'effet inverse, en diminuant l'activité immunosuppressive du FK506. En effet, Shirakata *et al.*, (1995) ont montré que l'addition de FKBP12 diminue l'activité anti-proliférative du FK506 *in vitro*, et que l'augmentation de sa concentration plasmatique est corrélée à des épisodes de rejet de greffe. Cet effet serait dû à la capture du FK506 par son immunophiline plasmatique, résultant en une diminution de la concentration active en médicament. Ainsi, si la formation d'un complexe FKBP12/FK506 est plutôt néfaste à une bonne immunosuppression, à l'opposé, la rétention de la CsA sous la forme du complexe CyPB/CsA serait plutôt favorable, en diminuant d'une part, sa séquestration dans les érythrocytes, et en favorisant d'autre part, son incorporation sous forme active dans les cellules sensibles. Afin de valider cette hypothèse, il sera nécessaire de mesurer, en suivi longitudinal, le taux de CyPB plasmatique chez les individus traités à la CsA. En particulier, il sera intéressant de vérifier si,

contrairement à la FKBP12, un taux très faible de CyPB plasmatique n'est pas corrélé à des phases de rejet de greffe. Dans ce cas, le dosage systématique de la CyPB plasmatique pourrait permettre de mieux suivre l'évolution de la greffe et d'appréhender son éventuel rejet.

En se basant sur nos travaux et les quelques données de la littérature, les propriétés des immunophilines sécrétées peuvent être rapprochées de celles de la famille des chimiokines. En effet, cette famille regroupe de petites protéines basiques, impliquées dans de nombreux phénomènes inflammatoires, tels que la mobilisation des leucocytes circulants et leur adhésion à l'endothélium (Hedrick & Zlotnik, 1996).

Bien que possédant un taux d'homologie important, ces protéines sont souvent spécifiques de populations distinctes de leucocytes. L'IL8 recrute essentiellement les neutrophiles, alors que les MIP-1 et RANTES sont plus spécialisées pour les populations lymphocytaires (Taub *et al.*, 1993). Une telle spécificité pourrait exister pour les immunophilines sécrétées. Ainsi, les CyPs de 18 kDa, isolées du Rat et de la Souris, mobilisent les neutrophiles, les éosinophiles et les monocytes, alors que la FKBP12 semble être spécifique des neutrophiles (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992 ; Leiva & Lyttle, 1992). La CyPB, en se fixant sur les lymphocytes T, pourrait être responsable de leur mobilisation. Un argument en faveur de cette hypothèse est l'activité anti-inflammatoire de la CsA. En particulier, administré dans le traitement du psoriasis, ce médicament réduit considérablement le nombre de lymphocytes au niveau des régions enflammées (Gupta *et al.*, 1989). Ainsi, la CsA pourrait agir en inhibant une activité chimiotactile de la CyPB impliquée dans le recrutement des lymphocytes T vers les lieux de l'inflammation.

La fixation des chimiokines sur leur récepteur génère un flux calcique rapide, impliqué dans les phénomènes de chimiotactisme. Or, l'activation des neutrophiles par la FKBP12 génère également un signal calcique, probablement impliqué dans les propriétés chimioattractantes de cette protéine (Bang *et al.*, 1995). De plus, la CyPB intracellulaire associée à la CAML régule l'activité d'un canal calcique et participe à l'activation de la calcineurine (Bram & Crabtree, 1994). Ainsi, le flux calcique induit par la fixation de la CyPB sur son récepteur membranaire pourrait intervenir dans des phénomènes de co-activation lymphocytaire, et/ou dans le signal nécessaire au recrutement de ces cellules.

Comme les chimiokines et de nombreuses autres protéines de la large famille des HBP, la CyPB interagit avec un second type de site de fixation, de nature glycanique sulfatée. Ces sites glycaniques pourraient jouer un rôle de réservoir, ou intervenir dans la présentation de

la CyPB pour son récepteur protéique. Bien que cette dernière propriété ait été avancée pour le FGF (Yayon *et al.*, 1991), elle est actuellement très controversée, notamment dans le cas des chimiokines qui ne nécessitent pas d'interactions avec les GAG sulfatés pour être actives (Koopmann & Krangel, 1997). Par contre, en fixant le ligand à proximité immédiate du récepteur protéique, ces sites glycaniques pourraient prolonger l'effet de la CyPB, même après son élimination de la circulation.

Des travaux récents ont souligné l'importance des interactions entre les chimiokines et les GAG sulfatés dans les propriétés biologiques associées à ces protéines. En effet, il était peu concevable qu'un gradient de concentration puisse rester stable dans le flux sanguin. En fait, il est maintenant établi que les chimiokines se fixent sur les GAG sulfatés de l'endothélium et que les cellules circulantes suivent ce gradient immobilisé, en "roulant" vers le lieu de l'inflammation. Plus généralement, il est reconnu que les chimiokines interviennent dans les mécanismes d'adhésion cellulaire (Tanaka *et al.*, 1993b). En effet, ces petites protéines possèdent deux sites de fixation séparés, leur permettant d'interagir simultanément avec leurs récepteurs protéiques et les GAG sulfatés. Ainsi, elles peuvent créer un pontage entre leucocytes et cellules endothéliales, et renforcer les interactions engagées par les sélectines (Green *et al.*, 1995). Tout comme les chimiokines, la CyPB possède deux sites de fixation distincts et éloignés. Elle peut donc également intervenir dans des phénomènes de pontage entre cellules exprimant au moins l'un des deux sites. Des travaux réalisés au Laboratoire ont permis de mettre en évidence des sites de fixation sur les plaquettes et les cellules endothéliales. Ces fixations feraient intervenir un récepteur de type lymphocytaire protéique. Ainsi, la fixation de la CyPB sur les sites glycaniques pourrait participer aux phénomènes d'adhésion lymphocytaire impliquant les cellules endothéliales ou les plaquettes.

La poursuite de ces travaux sur les rôles éventuels de la CyPB plasmatique devrait permettre de confirmer ces hypothèses et d'apporter de nouvelles informations sur les immunophilines sécrétées et leurs fonctions dans les mécanismes de la réponse inflammatoire.

## *Bibliographie*

---

- Ahuja S.S., Shrivastav S., Danielpour D., Balow J.E. & Boumpas D.T. (1995) Regulation of transforming growth factor-beta and its receptor by cyclosporine in human T lymphocytes. *Transplantation* **60**, 718-723.
- Akbar A.N., Salmon M. & Janossy G. (1991) The synergy between naive and memory T-cells during activation. *Immunol. Today* **12**, 184-189.
- Albers M.W., Williams R.T., Brown E.J., Tanaka A., Hall F.L. & Schreiber S.L. (1993) FKBP-rapamycin inhibits a cyclin-dependant kinase activity and a cyclin D1-cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. *J. Biol. Chem.* **266**, 22825-22829.
- Allain F., Denys A. & Spik G. (1994) Characterization of surface binding sites for cyclophilin B on a human tumor T-cell line. *J. Biol. Chem.* **269**, 16537-16540.
- Allain F., Boutillon C., Mariller C. & Spik G. (1995) Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies. *J. Immunol. Meth.* **178**, 113-120.
- 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. & 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.
- Arakawa H., Nagase H., Hayashi N., Fujiwara T., Ogawa M., Shin S. & Nakamura Y. (1994). Molecular cloning and expression of a novel human gene that is highly homologous to human FK506-binding protein 12 kDa (hFKBP-12) and characterization of two alternatively spliced transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 836-843.
- Arber S., Krause K.H. & 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. & 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. & 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., Heguy A. & Telford J.L. (1993) Calcium-dependent cyclosporin A-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by p56<sup>lck</sup>. *J. Biol. Chem.* **268**, 8406-8409.
- Bang H., Brume K., Nager C. & Feige U. (1993) Interleukin-8 is a cyclosporin A binding protein. *Experientia* **49**, 533-538.
- Bang H., Müller W., Hans M., Brune K. & Swandulla D. (1995) Activation of Ca<sup>2+</sup> signaling in neutrophils by the mast cell-released immunophilin FKBP12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3435-3438.
- Barre J. (1992) Les formes circulantes de la cyclosporine A. *Therapie* **47**, 301-304.
- Bartold P.M., Haynes D.R. & Vernon-Roberts B. (1989) Effect of mitogen and lymphokine stimulation on proteoglycan synthesis by lymphocytes. *J. Cell Physiol.* **140**, 82-90.

- Batiuk T.D., Pazderka F., Enns J., De Castro L. & Halloran P.F. (1995). Cyclosporine inhibition of leukocyte calcineurin is much less in whole blood than in culture medium. *Transplantation* **61**: 158-161.
- Baughman G., Wiederrecht G.J., Campbell N.F., Martin M.M. & Bougeois S. (1995) FKBP51, a novel T-cell-specific immunophilin capable of calcineurin inhibition. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4395-4402.
- Bennett K.L., Jackson D.G., Simon J.C., Tanczos E.T., Peach R., Modrell B., Stamenkovic I., Plowman G. & Aruffo A. (1995) CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J. Cell Biol.* **128**, 687-698.
- Benton B.M., Zang J.-H., & Thorner J. (1994) A novel FK506- and rapamycin-binding protein (FPR3 gene product) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a proline rotamase localized to the nucleolus *J. Cell. Biol.* **127**, 623-639.
- 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. & 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, Somers P.K., Wandless T.J., Burakoff S.J. & Schreiber S.L. (1990a) Probing immunosuppressant action with a non-natural immunophilin ligand. *Science* **250**, 556-558.
- Bierer B.E., Mattila P.S. Standaert R.F., Herzenberg L.A., Burakoff S.J., Crabtree G. & Schreiber S.L. (1990b) 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., Schreiber, S.L. & Burakoff, S.J. (1991) The effect of the immunosuppressant FK506 on alternate pathways of T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **21**, 439-445.
- Billich A., Winkler G., Aschauer H., Rot A. & Peichl P. (1997) Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **185**, 975-980.
- Bonnefoy-Berard N., Genestier L., Flacher M. & 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. & 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.
- Bowes L.G., Dumble L.J., Clunie G.J.A., Francis D.M.A., McDonald I.M. & Kincaid-Smith P. (1989) Increased risk of rejection in renal transplant recipients with in vitro cyclosporin-resistant lymphoid responses. *Transplant. Proc.* **21**, 1470-1471.
- Braaten D., Wellington S., Warburton D. & Luban J. (1996a) Assignment of cyclophilin A (PPIA) to human chromosome band 7p13 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **74**, 262

- Braaten D., Franke E.K. & Luban J. (1996b) Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of Human Immunodeficiency Virus type I before the initiation of reverse transcription. *J. Virol.* **70**, 3551-3560.
- Brabletz T., Pietrowski I. & 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.
- Bradbury M.G. & Parish C.R. (1989) Receptors on lymphocytes for endogenous splenic glycosaminoglycans. *Immunology* **66**, 546-553.
- Bram R.J., Hung D.T., Martin P.K., Schreiber S.L. & 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. & Crabtree G.R. (1994) Calcium signalling in T-cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* **371**, 355-358.
- Brillantes A.-M. B., Ondrias K., Scott A., Kobrinsky E., Ondriasova E., Moschella M.C., Jayaraman T., Landers M., Ehrlich B.E. & Marks A.R. (1994) Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506 binding protein. *Cell* **77**, 513-523.
- Brown E.J., Albers M.W., Shin T.B., Ichikawa K., Keith C.T., Lane W.S. & Schreiber S.L. (1994) A mammalian protein target by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**, 756-759.
- 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. & 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.
- Bush K.T., Hendrikson B.A. & Nigam S.K. (1994). Induction of the FK506-binding protein, FKBP13, under conditions which misfold protein in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **303**, 705-708.
- Byrne J.A., Butler J.L. & 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. & 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.
- Cafferkey R., Young P.R., McLaughlin M.M., Bergsma D.J., Koltin Y., Sathe G.M., Faucette L., Eng W.-K., Johnson R.K. & Livi G.P. (1993) Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6012-6023.
- Callebaut I., Renoir J.M., Lebeau M.C., Massol N., Burny A., Baulieu E.E. & Mornon J.P. (1992) An Immunophilin that binds Mr 90,000 heat shock protein : main structural features of a mammalian p59 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 6270.
- Cameron A.M., Steiner J.P., Sabatini D.M., Kaplin A.I., Walensky L.D. & Snyder S.H. (1995a) Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-

- triphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1784-1788.
- Cameron A.M., Steiner J.P., Roskams J.A. Ali S.M., Ronnett G.V. & Snyder S.H. (1995b) Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates  $Ca^{2+}$  flux. *Cell* **83**, 463-472.
- Cantrell D. (1994) G protein in lymphocyte signaling. *Curr. Op. Immunol.* **6**, 380-384.
- Cardenas M.E., Lorenz M., Hemenway C. & Heitman J. (1994) Yeast as model of T cells. *Perspect Drug Discovery Design.* **2**, 103-126.
- Cardenas M.E. & Heitman J. (1995) FKBP12-rapamycin target TOR2 is a vacuolar protein with an associated phosphatidylinositol-4 kinase activity. *EMBO J.* **14**, 5892-55907.
- Cardin A.D. & Weintraub H.J.R. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **9**, 21-32.
- Caroni P., Rothenfluh A., McGlynn E. & 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. & 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. & Roder J. (1994) Expression of the NK-TR gene is required for NK-like activity in human T-cells. *J. Immunol.* **152**, 2669-2674.
- Chambraud B., Rouviere-Fourmy N., Radanyi C., Hsiao K., Peattie D.A., Livingston D.J. & Baulieu E.E. (1993) Overexpression of p59-HBI (FKBP59), full length and domains, and characterization of PPIase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 160-166.
- Chaudhary P.M., Mechetner E.B. & Roninson I.B. (1992) Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* **80**, 2735-2739.
- Cirillo R., Triggiana M., Siri L., Cicarelli A., Pettit G.R., Condorelli M. & 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. & 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. & Crabtree G.R. (1994) Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes. *J. Biol. Chem.* **269**, 26431-26437.
- Colgan J., Yuan H.E.H., Franke E.K. & Luban J. (1996) Binding of the Human Immunodeficiency Virus type I gag polyprotein to cyclophilin A is mediated by the central region of capsid and requires gag dimerization. *J. Virol.* **70**, 4299-4310.
- Colley N.J., Baker E.K., Stamnes M.A. & Zuker C.S (1991) The cyclophilin homologue ninaA is required in the secretory pathway. *Cell*, **67**, 255-263.

- Colley N.J., Cassill J.A., Baker E.K. & Zuker C.S. (1995) Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 3070-3074.
- Colombani P., Robb A. & Hess A. (1985) Cyclosporin A binding to calmodulin : A possible site of action on T lymphocytes. *Science* **228**, 337-339.
- Connern C.P. & 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. & 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.
- Coss M.C., Winterstein D., Sowder R.C. & Simek S.L. (1996). Molecular cloning, DNA sequence analysis, and biochemical characterization of a novel 65-kDa FK506-binding protein (FKBP65). *J. Biol. Chem.* **270**, 29336-29341.
- Crompton M. & Costi A. (1988) Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by  $\text{Ca}^{2+}$ , inorganic phosphate and oxidative stress : a potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload. *Eur. J. Biochem.* **178**, 487-501.
- Crompton M., Ellinger H. & Costi A. (1988) Inhibition by cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **25**, 357-360.
- Czar M.J., Owens-Grillo J.K., Yem A.W., Leach K.L., Deibel M.R., Welsh M.J. & Pratt W.B. (1994) The hsp56 immunophilin component of untransformed steroid receptor complexes is localized both to microtubules in the cytoplasm and to the same non random regions within the nucleus as the steroid receptor. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1731-1741.
- Czar M.J., Lyons R.H., Welsh M.J., Renoir J-M & Pratt W.B. (1995) Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 1549-1560.
- Davis T.R., Tabatabaï L., Bruns K. Hamilton R.T. & Nilsens-Hamilton M. (1991) Basic fibroblast growth factor induces 3T3 fibroblasts to synthesize and secrete a cyclophilin-like protein and  $\beta_2$ -microglobulin. *Biochim. Biophys. Acta* **1095**, 145-152.
- DiLella A.G. (1991). Chromosomal assignment of the human immunophilin FKBP-12 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1427-1433.
- DiLella A.G. & Craig R.J. (1991). Exon organization of the human FKBP-12 gene : correlation with structural and functional protein domains. *Biochemistry* **30**, 8512-8517.
- DiLella A.G., Hawkins A., Craig R.J. Schreiber S.L. & Griffin C.A. (1992). Chromosomal band assignments of the genes encoding human FKBP12 and FKBP13. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 819-823.
- Dorfman T., Weimann A, Borsetti A, Walsh C.T. & Gottlinger H.G. (1997) Active-site residues of cyclophilin A are crucial for its incorporation into human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* **71**, 7110-7113.

- Dumont F.T., Staruch M.J., Koprak S.K., Melino M.R. & Sigal N.H. (1990) Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK506 and rapamycin. *J. Immunol.* **144**, 251-258.
- Dumont F.J., Staruch M.J., Koprak S.L., Siekierka J.J., Lin C.S., Harrison R., Sewell T., Kindt V.M., Beattie T.R., Wyvratt M. & 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. & Bierer B.E. (1993) A role for calcineurin in degranulation of murine cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **150**, 2591-2598.
- Emmel E.A., Verweij C.L., Durand D.B., Higgins K.M., Lacey E. & 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. & 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.
- Ferris C.D., Haganir R.L., Bredt D.S., Cameron A.M. & Snyder S.H. (1991) Inositol triphosphate receptor : phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2232-2235.
- Fischer G., Bang H. & Mech C. (1984) Detection of enzyme catalysis for *cis-trans* isomerization of peptide bonds using proline containing peptides as substrates. *Biochem. Biophys. Acta* **43**, 1101-1112.
- Fischer G. & 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. & Schmid F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**, 476-478.
- Fischer G. (1996) Cyclophilins in the context of the other families of peptidyl-peolyl *cis/trans* isomerases. *Workshop cyclophilin structure and function*.
- Flanagan W.M., Corthesy B., Bram R.J. & Crabtree G.R. (1991) Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* **352**, 803-807.
- Flanagan C.A., Schnieders E.A., Emerick A.W., Kunisawa R., Admon A. & Thorner J. (1993) Phosphatidylinositol 4-kinase : gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science* **262**, 1444-1448.
- Fleischer S. & Inui M. (1989) Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**, 333-364.
- Foor F., Parent S.A., Morin N., Dahl A.M., Ramadan N., Chrebet G., Bostian K.A. & Nielsen J.B. (1992) Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast. *Nature* **360**, 682-684.

- Foxwell B.M.J., Frazer G., Winters M., Hiestand P.C., Wenger R. & Ryffel B. (1988a) Identification of cyclophilin as the erythrocyte cyclosporin-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* **938**, 447-455.
- Foxwell B.M.J., Hiestand P.C., Wenger R. & Ryffel B. (1988b) 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. & Ryffel B. (1989) The mechanisms of action of cyclosporine. *Immunol Allergy Clin. North Am.* **9**, 79-93.
- Foxwell B.M.J., Woerly G., Husi H., Mackie A., Quesniaux V.F.J., Hiestand P.C., Wenger R.M. & Ryffel B. (1992) Identification of several cyclosporin binding proteins in lymphoid and non-lymphoid cells in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1138**, 115-121.
- Franke E.K., Yuan H.E.H. & Luban J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**, 359-362.
- Fraser J.D., Irving B.A., Crabtree G.R. & 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. & Weiss A. (1993) Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunol. Today* **14**, 357-362.
- Freskgard P.O., Bergenham N., Jonsson B.H., Svensson M. & Carlsson U. (1992) Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase. *Science* **258**, 467-468.
- Frey J.L., Bino T., Kantor R.R.S., Segal D.M., Giardina S.L. Roder J., Anderson S. & Ortaldo J.R. (1991) Mechanism of target cell recognition by natural killer cells : characterization of a novel triggering molecule restricted to CD3- large granular lymphocytes. *J. Exp. Med.* **174**, 1527-1536.
- Friedman J. & 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. & 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.
- Fruman D.A., Mather P.E., Burakoff S.J. & Bierer B.E. (1992a) Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2513-2517.
- Fruman D.A., Klee C.B., Bierer B.E. & Burakoff S.J. (1992b) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3686-3690.
- Fukuzawa M., Sharrow S.O. & Shearer G.M. (1989) Effect of cyclosporin A on T cell immunity. II. Defective thymic education of CD4 T helper cell function in cyclosporin A-treated mice. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1147-1152.
- Gaido M. & Cidlowski J. (1991) Identification, purification and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 18580-18585.

- Galat A., Lane W.S., Standeart R.F. & 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.
- Gallagher J.T., Turnbull J.E. & Lyon M. (1992) Patterns of sulphation in heparan sulphate: polymorphism based on a common structural theme. *Int. J. Biochem.* **24**, 553-560.
- Garcia del Moral R., O'Valle F., Andujar M., Aguilar M., Lucena M.A., Lopez-Hidalgo J., Ramirez C., Medina-Cano M.T., Aguilar D. & Gomez-Morales M. (1995) Relationship between P-glycoprotein expression and cyclosporin A in kidney. An immunohistological and cell culture study. *Am. J. Pathol.* **146**, 398-408.
- Gasc J.M., Renoir J.M., Faber L.E., Delahaye F. & Baulieu E.E. (1990) Nuclear localization of the two steroid receptor-associated proteins, hsp90 and p59. *Exp. Cell. Res.* **186**, 362-367.
- Giardina S.L., Coffman J.D., Young H.A., Potter S.J., Frey J.L., Ortaldo J.R. & Anderson S.K. (1996) Association of the expression of an SR-cyclophilin with myeloid cell differentiation. *Blood* **87**, 2269-2274.
- Gilat D., Cahalon L., Hershkovich R. & Lider O. (1996) Interplay of T cells and cytokines in the context of enzymatically modified extracellular matrix. *Immunol. Today* **17**, 16-20.
- Granelli-Piperno A., Inaba K. & Steinman R.M. (1984) Stimulation of lymphokine release from T lymphoblasts : Requirement for mRNA synthesis and inhibition by cyclosporin A. *J Exp Med* **160**, 1792-1802.
- Granelli-Piperno A. (1988) In situ hybridization for interleukin 2 and interleukin 2 receptor mRNA in T cells activated in the presence or absence of cyclosporin A. *J. Exp. Med.* **168**, 1649-1658.
- Green P.J., Yuen C-T., Childs R.A., Chai W., Miyasaka M., Lemoine R., Lubineau A., Smith B., Ueno H., Nicolaou K.C. & Feizi T. (1995) Further studies of the binding specificity of the leucocyte adhesion molecule, L-selectine, towards sulphated oligosaccharides : suggestion of a link between the selectin- and the integrin-mediated lymphocyte adhesion systems. *Glycobiology* **5**, 29-38.
- Griffiths E.J. & Halestrap A.P. (1991) Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from  $Ca^{2+}$  overload by inhibiting a matrix peptidylprolyl *cis-trans* isomerase. *Biochem. J.* **274**, 611-614.
- Griffiths E.J. & Halestrap A.P. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia but open during reperfusion. *Biochem. J.* **307**, 93-98.
- Haddy A., Swanson S.K.H., Born T.L. & Rusnak F. (1992) Inhibition of calcineurin by cyclosporin A-cyclophilin requires calcineurin B. *FEBS Lett.* **314**, 37-40.
- Haendler B., Hofer-Warbinek R. & 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. & Movva N.R. (1989) Yeast cyclophilin: isolation and characterization of the protein, cDNA and gene. *Gene* **83**, 39-46.
- Haendler B. & Hofer E. (1990) Characterization of the human cyclophilin gene and of related processed pseudogenes. *Eur. J. Biochem.* **190**, 477-482.

- Halestrap A.P. & Davidson A.M. (1990) Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  induced swelling of mitochondria by cyclosporin A is probably caused by binding to a matrix peptidylprolyl *cis-trans* isomerase and preventing its binding to the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* **268**, 153-160.
- Halestrap A.P., Connern C.P., Woodfield E.F., Griffiths E.J. & Kerr P.M. (1996) The role of mitochondrial matrix cyclophilin in the opening of the permeability transition pore and its involvement in ischaemia / reperfusion injury of the heart. *Workshop Cyclophilin Structure and Function*.
- Handschumacher R.E., Harding M.W., Rice J., Drugge R.J. & Speicher D.W. (1984) Cyclophilin : A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**, 544-547.
- Harding M.W., Handschumacher R.E. & Speicher D.W. (1986) Isolation and aminoacid sequence of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **261**, 8547-8555.
- Harding M.W., Galat A., Uchling D.E. & 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. & 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.
- Harnick D.H., Jayaraman T., Go L., Mulieri P. & Marks A.R. (1995) The human type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptor from T lymphocytes : structure, localization and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**, 2833-2840.
- Hart W. (1982) Biosynthesis of glycoaminoglycans by thymic lymphocytes. Effects of mitogenic activation. *Biochemistry* **21**, 6088-6096.
- Hasel K.W., Glass J.R., Godbout M. & Sutcliffe J.G. (1991) An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3483-3491.
- Haskard D.O. (1994) Adhesive proteins, in Haemostasis and Thrombosis (Bloom A.L., Forbes C.D. & Thomas R.P., eds) p 233-257, Longman Singapore Publishers Ltd, Singapore.
- Hedrick J.A. & Zlotnik A. (1996) Chemokines and lymphocyte biology. *Curr. Opinion Immunol.* **8**, 343-347.
- Heitman J., Movva N.R. & Hall M.N. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-909.
- Hendrickson B.A., Zhang W., Craig R.J., Jin Y.J., Bierer B.E., Burakoff S. & DiLella A.G. (1993). Structural organization of the genes encoding human and murine FK506-binding protein (FKBP) 13 and comparison to FKBP<sub>1</sub>. *Gene* **134**, 271-275.
- Hess A.D. & Tutschka P.J. (1980) Effect of cyclosporin on human lymphocyte responses *in vitro*. I. CsA allows for the expression of alloantigen-activated suppressor cells while preferentially inhibiting the induction of cytolytic effector lymphocytes in MLR. *J Immunol* **124**, 2601-2608.
- Hesterkamp T. & Bukau B. (1996) Identification of the prolylisomerase domain of *Escherichia coli* trigger factor. *FEBS Lett.* **385**, 67-71.

- Hesterkamp T., Hauser S., Lutcke H. & Bukau B. (1996) Escherichia coli trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4437-4441.
- Hiles I.D., Otsu M., Volinia S., Fry M.J., Gout I., Dhand R., Panayotou G., Ruiz-Larrea F., Thompson A., Totty N.F., Hsuan J.J., Courtneidge S.A., Parker P.J. & Waterfield M.D. (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase : structure and expression of the 110 kDa catalytic subunit. *Cell* **70**, 419-429.
- Hoffman K. & Handschumacher R.E. (1995) Cyclophilin-40 : evidence for a dimeric complex with hsp90. *Biochem J.* **307**, 5-10.
- Holloway M.P. & Bram R.J. (1996) A hydrophobic domain of Ca<sup>2+</sup>-modulating cyclophilin ligand modulates calcium influx signaling in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 8549-8552.
- Hsu V.L., Heald S.L., Harding M.W., Handschumacher R.E. & Armitage I.M. (1990) Structural elements pertinent to the interaction of cyclosporin A with its specific receptor protein, cyclophilin. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 131-140.
- Hultsch T., Albers M.W., Schreiber S.L. & Hohman R.I. (1991). Immunophilin ligands demonstrate common features of signal transduction leading to exocytosis or transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88**, 6229-6233.
- Hung H.T. & Schreiber S.L. (1992) cDNA cloning of a human 25 kDa FK506 and rapamycin binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **184**, 733-738.
- Husi H. & 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. & Zurini M.G.M. (1994b) Mapping of the immunophilin-immunosuppressant site of interaction on calcineurin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14199-14204.
- Ihrcke N.S., Wrenshall L.E., Lindman B.J. & Platt J.F. (1993) Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol. Today* **14**, 500-505.
- Inoue T., Yoshida Y., Isaka Y. & Tagawa K. (1993) Isolation of mitochondrial cyclophilin from bovine heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 857-863.
- Jackson D.G., Bell J.I., Dickinson R., Timans J., Shields J. & Whittle N. ((1995) Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. *J. Cell Biol.* **128**, 673-685.
- Jain J., McCaffrey P.G., Miner Z., Kerppola T.K., Lambert J.N., Verdine G.L., Curran T. & Rao A. (1993) The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and rejection. *Nature* **365**, 352-355.
- Jain J., McCaffrey P.G., Valge-Archer V.E. & Rao A. (1992) Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* **356**, 801-804.
- Jayaraman T., Brillantes A.-M. B., Timerman A.P., Erdjumen-Bromage H., Fleischer S., Tempst S. & Marks A.R. (1992) FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* **267**, 9474-9477.
- Jenkins M.K., Schwartz R.H. & Pardoll D.M. (1988) Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion. *Science* **241**, 1655-1668.

- Jin Y.J., Albers M.W., Lane W.S., Bierer B.E., Schreiber S.L. & Burakoff S.L. (1991). Molecular cloning of a membrane-associated human FK506- and rapamycin-binding protein, FKBP13. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6677-6681.
- Jin Y.J., Burakoff S.J. & Bierer B.E. (1992) Molecular cloning of a 25-kDa high affinity rapamycin binding protein, FKBP25. *J. Biol. Chem.* **267**, 10942-10945.
- Jin Y.J. & 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.
- Jobbagy A. & Kiraly K. (1966) Chemicals characterization fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. *Biochim. Biophys. Acta.* **124**, 166-175.
- Jones I. & Stuart D. (1996) Journey to the core of HIV. *Nature structural biology.* **3**, 818-820.
- June C.H., Ledbetter J.A., Linsley P.S. & Thompson C.B. (1990) Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today* **11**, 211-216.
- Karnitz L.M. & Abraham R.T. (1995) Cytokine receptor signaling mechanisms. *Curr. Opinion Immunol.* **7**, 320-326.
- Katagiri C., Kawamura T., Matsuzawa S., Mizuno Y., Matsumura S. & 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.
- Kay J.E. & Benzie C.R. (1990) T lymphocytes activation through the CD28 pathways is insensitive to inhibition by the immunosuppressive drug FK506. *J. Immunol.* **23**, 155-160.
- Kay J.E., Kromwel L., Doe S.E.A. & Denyer M. (1991) Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology* **72**, 544-549.
- Kay J.E. (1996) Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl *cis-trans* isomerases. *Biochem. J.* **314**, 361-385.
- Ke H., Zhao Y., Luo F., Weissman I. & Friedman J. (1993) Crystal structure of murine cyclophilin C complexed with immunosuppressive drug cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 11850-11854.
- Kern D., Drakenberg T., Wikstrom M., Forsen S., Bang H. & 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. & Fischer G. (1994) Reassessment of the putative chaperone function of prolyl *cis/trans*-isomerases. *FEBS Lett.* **348**, 145-148.
- Kern G., Kern D., Schmid F.X. & Fischer G. (1995) A kinetic analysis of the folding of human carbonic anhydrase II and its catalysis by cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **270**, 740-745.
- Kieffer L.J., Thalhammer T. & 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. & 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.

- Klintmalm G., Säwe J., Ringden O., von Bahr C. & Magnusson A. (1985) Cyclosporin plasma levels in renal transplant patients-association with renal toxicity and allograft metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporin with other drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* **43**, 630-635.
- Koletsy A.J., Harding M.W. & Handschumacher R.E. (1986) Cyclophilin : distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J. Immunol.* **137**, 1054-1059.
- Koltin Y., Faucette L., Bergsma D.L., Levy M.A., Cafferkey R., Koser P.L., Johnson R.K. & Livi G.P. (1991) Rapamycin sensibility in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase related to human FK506-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1718-1723.
- Koopmann W. & Krangel M.S. (1997) Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **272**, 10103-10109.
- 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. & 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.
- Kost S.L., Smith D.F., Sullivan W.P., Welch W.J. & Toft D.O. (1989) Binding of the heat shock proteins to the avian progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3829-3838.
- Kratz A., Darding M.W., Craft J., Mackworth-Young C.G. & Handschumacher R.E. (1992) Autoantibodies against cyclophilin in systemic lupus erythematosus and Lyme disease. *Clin. Exp. Immunol.* **90**, 422-427.
- Kroemer G., Zamzami N. & Susin S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**, 44-51.
- Kronbach T., Fisher V. & Meyers A. (1988) Cyclosporin metabolism in human liver : identification of a cytochrom P-450III gene family as the major cyclosporin-interacts with Fos and Jun. *Nature* **365**, 352-355.
- Krummrei U., Bang R., Schmidtchen R., Brune K. & Bang H. (1995) Cyclophilin A is a zinc-dependent DNA binding protein in macrophages. *FEBS Lett* **371**, 47-51.
- Kunz J., Henriquez R., Schneider U., Deuter-Reinhard M., Movva N.R. & Hall M.N. (1993) Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G<sub>1</sub> progression. *Cell* **73**, 585-596.
- Kuo C.J., Chung J., Fiorentino D.F., Flanagan W.M., Benis J., Crabtree G.R. (1992) Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* **358**, 70-73.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam E., Martin M.M., Timerman A.P., Sabers C., Fleischer S., Lukas T., Abraham R.T., O'Keefe S.J., O'Neil E.A. & Wiederrecht G.J. (1995) A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 26511-26522.
- Lane H.A., Fernandez A., Lamb N.J.C. & thomas G. (1993) p70S6k function is essential for G1 progression. *Nature* **363**, 170-172.

- Larson R.S., Corbi A.L., Berman L. & Springer T. (1989) Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit : an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J. Cell. Biol.* **108**, 703-712.
- Lebeau M.C., Massol N., Herrick J., Faber L.E., Renoir J.M., Radanyl C. & Baulieu E.E. (1992) P59, an hsp 90-binding protein. Cloning and sequencing of its cDNA and preparation of a peptide-directed polyclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **267**, 4281-4284.
- Lederman S., Gulick R. & Chess L. (1989) Dextran sulphate and heparin interact with CD4 molecules to inhibit the binding of coat protein (gp120) of HIV. *J. Immunol.* **143**, 1149-1154.
- Legrand D., Van Berkel P.H.C., Salmon V., Van Veen H.A., Slomianny M-C, Nuijens J. & Spik G. (1997) The N-terminal Arg<sup>2</sup>, Arg<sup>3</sup> and Arg<sup>4</sup> of human lactoferrin interact with sulfated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T cells. *Biochem. J.* (sous presse).
- Legrue S.J., Friedman A.W. & 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. & Dedman J.R. (1986) Does the binding of cyclosporin to calmodulin result in immunosuppression? *Science* **234**, 68-71.
- Leiva M.C. & Lyttle R.C. (1992) Leucocyte chemotactic activity of FKBP and inhibition by FK506. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1178-1183.
- Lilie H., Lang K., Rudolph R. & Buchner J. (1993) Prolyl isomerases catalyze antibody folding *in vitro*. *Prot. Science* **2**, 1490-1496.
- Lindholm A. (1991a) Factors influencing the pharmacokinetics of cyclosporin in man. *Ther. Drug Monit.* **13**, 465-477.
- Lindholm A. (1991b) Therapeutic monitoring of cyclosporin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **41**, 273-281.
- Linsley P.S., Brady W., Urnes M., Grosmaire L.S., Damle N.K. & 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. & 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. & 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. & Schreiber S.L. (1992) Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* **31**, 3896-3901.
- Lodish H.F. & Kong N. (1991) Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **266**, 14835-14838.
- Lorenz M.C. & Heitman J. (1995) TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKPB12-rapamycin. *J. Biol. Chem.* **270**, 27531-27537.

- Luban J., Bossolt K.L., Franke E.K., Kalpana G.V. & Goff S.P. (1993) Human immunodeficiency virus type I *gag* protein binds to cyclophilin A and B. *Cell* **73**, 1067-1078.
- Maki N., Sekiguchi F., Nishimaki J., Miwa K., Hayano T., Takahashi N. & Suzuki M. (1990). Complementary DNA encoding the human T-cell FK506-binding protein, a peptidylprolyl cis-trans isomerase distinct from cyclophilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5440-5443.
- Mann D.M., Romm E. & Migliorini M. (1994) Delineation of the glycosaminoglycan binding site in the inflammatory response protein lactoferrin. *J. Biol. Chem.* **269**, 23661-23667.
- Mariller C., Allain F., Kouach M. & Spik G. (1996a) Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Biochem. Biophys. Acta* **1293**, 31-38
- Mariller C., Heandler B., Allain F., Denys A. & Spik G. (1996b) Involvement of the N-terminal part of cyclophilin B in the interaction with its receptor on Jurkat T-cells. *Biochem. J.* **317**, 571-576.
- Marks W.H., Harding M.W., Handschumacher R., Marks C. & Lorber M.I. (1991) The immunochemical distribution of cyclophilin in normal mammalian tissues. *Transplantation* **52**, 340-345.
- Marks A.R. (1996) Cellular function of immunophilins. *Physiological reviews* **76**, 631-649.
- Massague J. (1983) Epidermal growth factor-like transforming growth factor. .II. Interactions with epidermal growth factor receptots in human placenta membranes and A 431 cells. *J. Biol. Chem.* **258**, 13614-13620.
- Massol N., Lebeau M.C., Renoir J.M., Faber L.E. & Baulieu E.E. (1992). Rabbit FKBP59-heat shock protein binding immunophilin (HBI) is a calmodulin binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1330.
- Masy E., Labalette-Houache M. & Dessaint J.P. (1994) Individual susceptibility to cyclosporine: possible involvement of the CD28/CD80 (B7/BB1) pathway. *Transplant. Proc* **26**: 2846-2848.
- Mattila P.S., Ullman K., Fiering S., Emmel E.A., McCutcheon M., Crabtree G.R. & 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. & 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. & 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. & Lorber M.I. (1992) The effect of cyclosporin administration on the cellular distribution and content of cyclophilin. *Transplantation* **53**, 460-466.
- Metcalf S. (1984) Cyclosporine does not prevent cytoplasmic calcium changes associated with lymphocyte activation. *Transplantation* **38**, 2-5.
- Mi H., Kops O., Zimmermann E., Jäschke A. & Tropschug M. (1996) A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Lett.* **398**, 201-205.

- Mignery G., Sudhof T., Takei K. & Camilli P. (1989) Putative receptor for 1,4,5-triphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature Lond.* **342**, 192-195.
- Mignery G.A., Newton C.L., Archer B.T. & Sudhof T.C. (1990) Structure and expression of the rat inositol-1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 12679-12685.
- Mikol V., Kallen J. & 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.
- Minta A., Kao J.P.Y. & Tsien R.Y. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* **264**, 8171-8178.
- Monfar M., Lemon K., Grammer T., Cheatham L., Chung J., Vlahos C. & Blenis J. (1995) Activation of pp70/85 S6 kinases in interleukine-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 326-337.
- Montague J.W., Gaido M.L., Frye C. & Cidlowski J.A. (1994) A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **269**, 18877-18880.
- Montague, J.W. & Cidlowski, J.A. (1996) Cellular catabolism is apoptosis : DNA degradation and endonuclease activation. *Experientia* **52**, 957-962.
- Montague J.W., Hughes F.M.J., Cidlowski J.A. (1997) Native recombinant cyclophilin A, B and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 6677-6684.
- Morice W.G., Brunn G.J., Wiederrecht G., Siekierka J.J., Abraham R.T. (1993) Rapamycin-induced inhibition of p34<sup>cdc2</sup> kinase activation is associated with G<sub>1</sub>/S-phase growth arrest in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **268**, 3734-3738.
- Morris R.E. (1992) Rapamycins: antifungal, antitumour, antiproliferative and immunosuppressive macrolides. *Transplant. Rev.* **6**, 39-42.
- Moss M.L., Palmer R.E., Kuzmic P., Dunlap B.E., Henzel W., Kofron J.L., Mellon W.S., Royer C.A. & 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.
- Motta I., Colle J.H., Shidani B. & Ruffabachi P. (1991) Il-2/Il-4-independent T helper cell generation during an *in vitro* antigenic stimulation of mouse spleen cells in the presence of cyclosporin A. *Eur J Immunol* **21**, 551-557.
- Munro S. & Pelham R.B. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
- Nair S.C., Rimerman R.A., Toran E.J., Chen S., Prapapanich V., Butts R.N. & Smith D.F. (1997) Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 594-603.
- 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. & Harding M.W. (1993) Immunosuppressive activity of [MeBm<sub>2</sub>t]<sup>1</sup>-D-diaminobutyryl-8-, and D-aminopropyl-8-cyclosporin analogues correlates with inhibition of calcineurin phosphatase activity. *J. Immunol.* **150**, 2139-2147.

- Nelson R.M., Cecconi O., Roberts W.G., Aruffo A., Linhardt R.J. & Bevilacqua M.P. (1993) Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* **82**, 3253-3258.
- Nestel F.P., Colwill K., Harper S., Pawson T. & Anderson S.K. (1996) RS cyclophilins : Identification of NK-TR<sub>1</sub>-related cyclophilin. *Gene* **180**, 151-155.
- Nicolli A., Basso E., Petronilli V., Wenger R.M. & Bernardi P. (1996) Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* **271**, 2185-2192.
- Nigam S.K., Jin Y.J., Jin M.J., Bush K.T., Bierer B.E. & Burakoff S.J. (1993). Localization of the FK506-binding protein, FKBP13, to the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **294**, 511-515.
- O'Keefe S.J., Tamura J., Kincaid R.L. Tocci M.J. & O'Neill E.A. (1992) FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* **357**, 692-694.
- Ondek B., Hardy R.W., Baker E.K., Stamnes M.A., Shieh B-H & Zuker C.S. (1992) Genetic dissection of cyclophilin function. *J. Biol. Chem.* **267**, 16460-16466.
- Ortaldo J.R., Mason A.T., Mason L.H., Winkler-Pickett R.T., Gosselin P. & Anderson S.K. (1997) Selective inhibition of human and mouse natural killer tumor recognition using retroviral antisense in primary natural killer cells : involvement with MHC class I killer cell inhibitory receptors. *J. Immunol.* **158**, 1262-1267.
- Otsuka M., Terada Y., Yang T.X., Nonoguchi H., Tomita K. & Marumo F. (1994) Localization of cyclophilin A and cyclophilin C mRNA in murine kidney using RT-PCR. *Kidney Intern.* **45**, 1340-1345.
- Owens-Grillo J.K., Hoffman K., Hutchison K., Yem A.W., Deibel J.M.R., Handschumacher R.E. & Pratt W.B. (1995) The cyclosporin A-binding immunophilin Cyp40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 20479-20484.
- Owens-Grillo J.K., Czar M.J., Hutchison K.A., Hoffman K., Perdew G.H. & Pratt W.B. (1996) A model of protein targeting mediating by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *J. Biol. Chem.* **271**, 13468-13475.
- Parish C.R. & Snowden J.M. (1985) lymphocytes express a diverse array of specific receptors for sulphated polysaccharides. *Cell. Immunol.* **91**, 201-214.
- Pastor M.I., Reif K. & Cantrell D. (1995) The regulation and function of p21<sup>ras</sup> during T-cell activation and growth. *Immunol. Today* **16**, 159-164.
- Peattie D.A., Harding M.W., Fleming M.A., Decenzo M.T., Lippke J.A., Livingston D.J. & Benasutti M. (1992) Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 10974-10978.
- Peattie D.A., Hsiao K., Benasutti M. & Lippke J.A. (1994). Three distinct messenger RNAs can encode the human immunosuppressant-binding protein FKBP12. *Gene* **150**, 251-257.

- Peddada L.B., McPherson J.D., Law R., Wasmuth J.J., Youderian P. & Deans R.J. (1992) Somatic cell mapping of the human cyclophilin B gene (PPIB) to chromosome 15. *Cytogenet. Cell. Genet.* **60**, 219-221.
- Perrot-Applanat M., Cibert C., Geraud G., Renoir J.M. & Baulieu E.E. (1995) The 59 kDa FK506-binding protein, a 90 kDa heat shock protein binding immunophilin (FKBP59-HBI), is associated with the nucleus, the cytoskeleton and mitotic apparatus. *J. Cell. Biol.* **108**, 2037-2051.
- Pober J.S. (1988) Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* **133**, 426-433.
- Povlsen J.V., Rasmussen A., Madsen M. & Lamm L.U. (1990) Cyclosporin-induced immunosuppression *in vitro* : variation in sensitivity and binding capacity. *Scand. J. Immunol.* **32**, 45-51.
- Prashar Y., Khanna A., Sehajpal P., Sharma V.K. & Suthanthiran M. (1995) Stimulation of transforming growth factor-beta 1 transcription by cyclosporine. *FEBS Lett.* **358**, 109-112.
- Pratt W.B. & Toft D.O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**, 306-360.
- Price D.J., Grove J.R., Calvo V., Avruch J. & Bierer B.E. (1992) Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* **257**, 973-977.
- Price E.R., Zydowsky L.D., Jin M., Baker C.H., McKeon F.D. & 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 E.R., Jin M., Lim D., Pati S., Walsh C.T. & 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. (1993) Immunosuppressants : tools to investigate the physiological role of cytokines. *Bioessays* **15**, 731-734.
- Radanyl C., Chambraud B. & Baulieu E.E. (1994). The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90-kDa heat shock protein is encoded by its tetratricopeptide repeat domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11197-11201.
- Rahfeld J.U., Schierhorn A., Mann K. & 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. & 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. & 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. & House A.K. (1993) The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptid repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J. Biol. Chem.* **268**, 13187-13192.

- Ratajczak T. & Carrello A. (1996) Cyclophilin 40 (CyP-40) mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for hsp90 binding. *J. Biol. Chem.* **271**, 2961-2965.
- Ratajczak T., Woollatt E., Kumar P., Ward B.K., Minchin R.F. & Baker E. (1997) Cyclophilin 40 (PPID) gene map position 4q 31.3. *Chromosome Res.* **5**, 151.
- Renoir J.M., Mester J., Buchou T., Catelli M.G., Tuohimaa P., Binart N., Joab I., Radanyl C. & Baulieu E.E. (1984) Purification by affinity chromatography and immunological characterization of a 110 kDa component of the chick oviduct progesterone receptor. *Biochemistry* **217**, 685-692.
- Renoir J.M., Radanyl C., Faber L.E. & Baulieu E.E. (1990) The non-DNA binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59 kilodalton protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 10740.
- Renoir J.M., Le Bihan S., Mercier-Bodard C., Gold A., Arjomandi M., Radanyl C. & Baulieu E.E. (1994) Effet of immunosuppressants FK506 and rapamycin on the heterooligomeric form of the progesterone receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **48**, 101-110.
- Renoir J.M., Mercier-Bodard C., Hoffman K., Le Bihan S., Ning Y.M., Sanchez E.R., Handschumacher R.E. & Baulieu E.E. (1995) Cyclosporin A potentiates the dexamethasone-induced mouse mammary tumor virus-chloramphenicol acetyltransferase activity in LMCAT cells : a possible role for different heat shock protein-binding immunophilins in glucocorticoid receptor-mediated gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4977-4981.
- Richards F.M., Milner J. & Metcalfe S. (1992) Inhibition of the serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A in lymphocytes : effect on mRNA levels for interleukin-2, IL-2R $\alpha$ , krox-24, p53, hsc70 and cyclophilin. *Immunology* **76**, 642-647.
- Rinfret A. & 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. & 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., Menez A. & Galat A. (1993) On the localization of FKBP25 in T-lymphocytes. *FEBS lett.* **315**, 247-251.
- 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. & 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.
- Ruff V.A., Yem A.W., Munns P.L., Adams L.D., Reardon I.M., Deibel M.R. & Leach K.L. (1992) Tissue distribution and cellular localization of hsp56, an FK506-binding protein. Characterization using a highly specific polyclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **267**, 21285-21288.
- Ryffel B., Goetz U. & Heuberger B. (1982) Cyclosporin receptors on human lymphocytes. *J. Immunol.* **129**, 1978-1982.

- Ryffel B., Woerly G., Greiner B., Haendler B., Mihatsch M.J. & 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. & Foxwell B.M.J. (1992) Covalent binding of cyclosporine inhibits irreversibly T-lymphocyte activation. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 953-960.
- Ryffel B. (1993) Cyclosporin binding proteins. Identification, distribution, function and relation to FK binding proteins. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1-12.
- Ryffel B., Woerly G., Murray M., Eugster H.P. & Car B. (1993) Binding of active cyclosporins to cyclophilin A and B, complex formation with calcineurin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1074-1083.
- Sabatini D.M., Erdjument-Bromage H., Liu M., Tempst P. & Snyder S.H. (1994) RAFT1 : a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**, 35-43.
- Sabatini D.M., Pierchala B.A., Barrow R.K., Schell M.J. & Snyder S.H. (1995) The rapamycin and FKBP12 Target (RAPT) display phosphatidylinositol 4-kinase activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 20875-20878.
- Sabers C.J., Martin M.M., Brunn G.J., Williams J.M., Dumont F.J., Wiederrecht G. & Abraham R.T. (1995) Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cell. *J. Biol. Chem.* **270**, 815-822.
- Saeki T., Ueda K., Tanigawara Y., Hori R. & Komano T. (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* **268**, 6077-6080.
- Sanchez E.R., Faber L.E., Henzel W.J. & Pratt W.B. (1990) The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with the 70- and a 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry* **29**, 5145-5152.
- Sander B., Brigati C. & 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. & Handschumacher R.E. (1992) Immunofluorescent localization and immunochemical determination of cyclophilin-A with specific rabbit antisera. *Transplantation* **54**, 904-910.
- Satoh T., Minami Y., Kono T., Yamada K., Kawahara A., Taniguchi T. & Kasiro Y. (1992) Interleukine 2-induced activation of Ras requires two domains of interleukine 2 receptor  $\beta$  subunit, the essential region for growth stimulation and Lck-binding domain. *J. Biol. Chem.* **267**, 25423-25427.
- Scatchard G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672.
- Schall T.J., Bacon K., Toy K.J. & Goeddel D.V. (1990) Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**, 669-671.
- Schneider H., Charara N., Schmitz R., Wehrli S., Mikol V., Zurini M.G.M., Quesniaux V.F.J. & 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. & 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.
- Schreiber S.L. (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* **251**, 283-287.
- Schreiber S.L. & Crabtree G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**, 136-142.
- 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.
- Sewell T.J., Lam E., Martin M.M., Leszyk J., Weidner J., Calaycay J., Griffin P., Williams H., Hung S., Cryan J., Sigal N.H. & Wiederrecht G.J. (1994) Inhibition of calcineurin by a novel FK506 binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 21094-21102.
- Sherry B., Yarlett N., Strupp A. & 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. & 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. & 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.
- Shirakata Y., Kobayashi M., Ohtsuka K., Sugano M., Terajima H., Ikai I., Okajima H., Egawa H., Inomata Y., Inamoto T., Tanaka K. & Yamaoka Y. (1995) Inhibitory effect of plasma FKBP12 on immunosuppressive activity of FK506. *Transplantation* **60**, 1582-1587.
- Siekierka J.J., Staruch M.J., Hung S.H.Y. & 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
- Siekierka J.J., Hung S.H.Y., Poe M., Lin C.S. & 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.
- Siekierka J.J., Wiederrecht G., Greulich H., Boulton D., Hung S., Cryan J., Hodges P. & Sigal N. (1990). The cytosolic-binding protein for the immunosuppressant FK506 is both a ubiquitous and highly conserved peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *J. Biol. Chem.* **265**, 21011-21015.
- Sigal N.H., Dumont F., Durette P., Siekierka J.J., Peterson L., Rich D.H., Dunlap B.E., Staruch M.J., Melino M.R., Koprak S.L. Williams D., Witzel B. & 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. & Dumont F.J. (1992) Cyclosporin A, FK-506 and rapamycin: Pharmacological probes of lymphocyte signal transduction. *Ann. Rev. Immunol.* **10**, 519-560.
- Simons-Evelyn M., Young H.A. & Anderson S.K. (1997) Characterization of the mouse *nktr* gene and promoter. *Genomics* **40**, 94-100.

- Smith D.F., Faber L.E. & Toft D.O. (1990) Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 3996-3401.
- Smith D.F., Albers M.W., Schreiber S.L., Leach K.L. & Deibel M.R. (1993). FKBP54, a novel FK506-binding protein in avian progesterone receptor complexes and HeLa extracts. *J. Biol. Chem.* **268**, 24270-24273.
- Smith T., Ferreira L.R., Hebert C., Norris K. & Sauk J.J. (1995) Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmic reticulum with procollagen into pre-golgi intermediate vesicles. *J. Biol. Chem.* **270**, 18323-18328.
- 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. & Movva N.R. (1991) A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J. Biol. Chem.* **266**, 10735-10738.
- Springer T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314.
- Stamnes M.A., Shieh B.H., Chuman L., Harris G.L. & 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.
- Steiner J.P., Dawson T.M., Fotuhi M., Glatt C.E., Snowman A.M., Cohen N. & Snyder S.H. (1992). High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature* **358**, 584-587.
- Steinmann B., Bruckner P. & 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.
- Stoller G., Rucknagel K.P., Nierhaus K.H., Schmid F.X., Fischer G. & Rahfeld J.U. (1995) A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.* **14**, 4939-4948.
- Stoller G., Tradler T., Rucknagel K.P., Rahfeld J.U. & Fischer G. (1996) An 11.8 kDa proteolytic fragment of the E. coli trigger factor represents the domain carrying the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. *FEBS Lett.* **384**, 117-122.
- Stringer SE & Gallagher J.T. (1997) Heparan sulphate. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 709-714.
- Stütz A. (1992) Immunosuppressive macrolides. *Transplant. Proc.* **24**, 22-25.
- Swanson S.K.H., Born T., Zydowsky L.D., Cho H., Chang H.Y., Walsh C.T. & 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. & Sambrook J. (1993) Proline isomerases function during heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5853-5857.
- Szamel M., Bartels F. & 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- $\beta$ . *Eur. J. Immunol.* **23**, 3072-3081.
- Tai P.K., Maeda Y., Nakao K., Wakim N.G., Duhrring J.L. & Faber L.E. (1986) A 59 kDa protein associated with progestin estrogen, androgen and glucocorticoid receptors. *Biochemistry* **25**, 5269.

- Tai P-K.K., Albers M.W., Chang H., Faber L.E. & Schreiber S.L. (1992) Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science* **256**, 1315-1318.
- Taicham R., Merida I., Turigoe T., Gaulton G.N. & Reed R.C. (1993) Evidence that protein kinase p56-lck regulates the activity of phosphatidylinositol-3'-kinase in interleukine-2-dependent T-cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 20031-20036.
- Takahashi N., Hayano T. & 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. & Ishii N. (1992) Cloning of the  $\gamma$  chain of the human IL-2 receptor. *Science* **257**, 379-382.
- Tamai I. & 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.
- Tanaka Y., Adams D.H., Hubscher S., Hirano H., Siebenlist U. & Shaw S. (1993a) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* **361**, 79-82.
- Tanaka Y., Adams D.H. & Shaw S. (1993b) Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol. Today* **14**, 111-115.
- Tanveer A., Virji S., Andreeva L., Totty N.F., Hsuan J.J. & Ward J.M. (1996) Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by  $Ca^{2+}$  and oxidant stress. *Eur. J. Biochem.* **238**, 166-172.
- Taub D.D., Conlon K., Lloyd A.R., Oppenheim J.J. & Kelvin D.J. (1993) Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ . *Science* **260**, 355-358.
- Terada N., Lucas J.J., Szepesi A., Franklin R.A., Takase K. & Gelfand E.W. (1992) Rapamycin inhibits the phosphorylation of p70 S6 kinase in IL-2 and mitogen-activated human T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1315-1321.
- Thali M., Bukovsky A., Kondo E., Rosenwirth B., Walsh C.T., Sodroski J. & 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. & Fesik S.W. (1993) Solution structure of the cyclosporin A/cyclophilin complex by NMR. *Nature* **361**, 88-91.
- Timerman A.P., Ogunbunmi E., Freund E., Wiederrecht G., Marks A. & Fleischer S. (1993) The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK506 binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 22992-22999.
- Timerman A.P., Wiederrecht G., Marcy A. & Fleischer S. (1995) Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP12 and the FKBP-Ryanodine receptor complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 2451-2459.
- Tocci M.J., Matkovich D.A., Collier K.A., Kwok P., Dumont F., Lin S., Degudicibus S., Siekierka J.J., Chin J. & Hutchinson N.I. (1989) The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J. Immunol.* **143**, 718-726.

- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- Trenn G., Taffs R., Hohman R., Kincaid R., Shevach E.M. & 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. & Neupert W. (1988) Cyclosporin A-binding protein (cyclophilin) of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **28**, 14433-14440.
- Tropschug M., Barthelmess I.B. & 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. & Steinmuller R. (1984) Cloned Lyt2+ cytolytic T lymphocytes destroy allogenic tissue *in vivo*. *J. Exp. Med.* **159**, 234-239.
- Ullman K.S., Northrop J.P., Verweij C.L. & 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.
- Valent Q.A., Kendall D.A., High S., Kusters R., Oudega B. & Luirink J. (1995) Early events in preprotein recognition in E. Coli : interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO. J.* **14**, 5494-5505.
- Von Wartburg A. & Traber R. (1986) Chemistry of the natural cyclosporin metabolites. *Prog. Allergy* **38**, 28-45.
- Wang T., Donahoe P.K. & Zervos A.S. (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF- $\beta$  family with the immunophilin FKBP-12. *Science*, **265**, 674-676.
- Weiss A. & Littman D.R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-274.
- Wiederrecht G., Martin M.M., Sigal N.H. & Siekierka J.J. (1992). Isolation of a human cDNA encoding a 25 kDa FK-506 and rapamycin binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 298-303.
- Wilson A.P. & Rider C.C. (1991) Murine T lymphocytes and T-lymphoma cells produce chondroitin sulphate and heparan sulphate proteoglycans and free heparan sulphate glycoaminoglycan. *Immunology* **72**, 27-33.
- Witt D.P. & Lander A.D. (1994) Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr. Biol.* **4**, 394-400.
- Woodfield K.Y., Price N.T. & Halestrap A.P. (1997) cDNA cloning of rat mitochondrial cyclophilin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1351**, 27-30.
- Xu Q., Leiva M.C., Fischkoff S.A., Handschumacher R.E. & Lyttle C.R. (1992) Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **267**, 11968-11971.
- Yamamoto-Hino M., Sugiyama K., Hikichi M., Mattel K., Hasegawa S., Sekine S., Sakurada K., Miyakawa A., Furuichi T., Hasegawa M. & Mikoshiba K. (1994) Cloning and characterization of human type 2 and type 3 inositol 1,4,5-triphosphate receptors. *Receptors Channels.* **2**, 9-22.
- Yan J. & De Franco D.B. (1996) Assessment of glucocorticoid receptor-heat shock protein 90 interactions *in vivo* during nucleocytoplasmic trafficking. *Mol. Endocrinol.* **13**, 3-7.

- Yayon A., Klagsbrun M., Esko J.D., Leder P. & Ornitz D.M. (1991) Cell surface, heparin like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its affinity receptor. *Cell* **64**, 841-848.
- Yem A.W., Tomasselli A.G., Heinrikson R.L., Zurcher-Neely H., Ruff V.A., Johnson R.A. & Deibel M.R. (1992) The hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *J. Biol. Chem.* **267**, 2868-2871.
- Yokoi H., Shimizu Y., Anazawa H., Lefebvre C.A., Korneluk R.G. & Ikeda J.E. (1996) The structure and complete nucleotide sequence of the human cyclophilin 40 (PPID) gene. *Genomics* **35**, 448-455.
- Zeder-Lutz G., Wenger R., Van Regenmortel M.H.V. & Altschuh D. (1993) Interaction of cyclosporin A with a Fab fragment or cyclophilin. *FEBS Lett.* **326**, 153-157.
- Zou S., Magura C.E. & Hurley W.L. (1992) Heparin-binding properties of lactoferrin and lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol.* **103**, 889-895.
- Zydowsky L.D., Etzkorn F.A., Chang H.Y., Ferguson S.B., Ho S.I. & Walsh C.T. (1992) Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition. *Protein Sci.* **1**, 1092-1099.

## *Appendice technique*

---

## I- Matériels

### A- La CyPB

La CyPB humaine recombinante est produite et purifiée au laboratoire comme décrit par Spik *et al.* (1991). Brièvement, l'insert introduit dans le plasmide pKK233-2 (Pharmacia) correspond à la forme tronquée de l'ADNc, dépourvu de la séquence codant pour le peptide signal. Ainsi, la CyPB recombinante produite à partir de ce plasmide correspond à la protéine native. L'expression de la CyPB dans les bactéries compétentes EC682 est induite par IPTG et la fermentation est poursuivie pendant 3 h.

Après extraction des protéines à partir du culot bactérien, la purification de la CyPB est réalisée par chromatographie d'échange de cations sur une colonne Mono-S en mode FPLC (Pharmacia). L'élution des protéines retenues se fait dans du tampon phosphate 20 mM, pH 6,5 par un gradient discontinu en NaCl. Cette méthode de purification permet de récupérer la majorité de la CyPB dans la fraction 0,22 M en NaCl, avec un taux de pureté supérieur à 95%.

Les peptides N- et C-terminaux de la CyPB ont été synthétisés au laboratoire de chimie des Biomolécules du Prof. A. Tartar (Unité Associée n°1319 du Centre National de la Recherche Scientifique, Lille, France). Ces peptides correspondent respectivement aux 25 premiers résidus d'acides aminés N-terminaux et aux 15 derniers résidus d'acides aminés C-terminaux.

### B- Les dérivés de cyclosporine

La CsA (Sandimmun ®) est obtenue auprès de Sandoz-France. Quant aux dérivés CsG et CsH, ils nous ont été fournis par le Dr. Borel (Sandoz, Bâle). Elles sont diluées dans l'éthanol à 1 mg/ml juste avant l'utilisation.

Les dérivés radiomarqués, [<sup>3</sup>H]-CsA (10,1 Ci/mmol, 250µCi/ml) et [<sup>14</sup>C]-CsA (0,140 Ci/mmol, 245 µCi/ml) sont également obtenus auprès de Sandoz-France.

### C- Les anticorps anti-CyPB

#### 1- Les anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux anti-CyPB sont préparés chez le lapin par injections soit de CyPB recombinante, soit de peptides N- et C-terminaux couplés à la KLH. Après plusieurs rappels, le sang est prélevé et la fraction IgG est purifiée du sérum par précipitation au sulfate d'ammonium. Les anticorps sont conservés à -20°C à une concentration de 1 mg/ml dans du PBS/ glycerol 40%, pH 7,4 (Allain *et al.*, 1995).

Pour les tests ELISA, les anticorps sont biotinylés. Après dialyse (1 nuit à 4°C) dans du tampon bicarbonate pH 8,6, 2 mg d'anticorps anti-CyPB sont incubés 1 h à température ambiante en présence de 74 µg de sulfo-NHS-LC-Biotine (Pierce Chemical Co). La biotine libre est éliminée par plusieurs cycles de filtration sur microconcentrateur et les anticorps biotinylés sont conservés à 2 mg/ml dans du PBS pH7,4.

### 2- Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux anti-CyPB sont préparés chez la souris au laboratoire Hybridolab de l'Institut Pasteur de Paris. Après injection de CyPB recombinante et criblage des clones obtenus, quatre anticorps ont été retenus pour leur réactivité. Nous avons utilisé le clone 48-19 présentant une forte spécificité et aucune réaction croisée avec les autres isoformes des CyPs. Cependant, ces anticorps ne reconnaissent que la forme dénaturée de la protéine d'où leur utilisation unique pour les expériences d'immunorévélation en Western blot.

### **D- Les lignées cellulaires**

Les cellules T des lignées Jurkat, Molt-4 et HSB2 ainsi que les cellules B de la lignée LiCr proviennent de l'Institut Pasteur de Lille. Les cellules B de la lignée Raji sont obtenues auprès de l'Etablissement de transfusion sanguine de Lille. Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Life Technologies, Inc.) contenant 2mM de L-glutamine, 20mM HEPES, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, de la gentamycine (5µg/ml), pH 7,3, supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (SVF). Elles sont divisées tous les deux jours, de manière à maintenir la concentration cellulaire entre 0,5 et 1 x 10<sup>6</sup> cellules/ml.

## **II- Préparation des ligands**

La [<sup>125</sup>I]-CyPB est obtenue en incubant 100µg de protéine avec 0,3 mCi de Na-[<sup>125</sup>I] (Amersham Corp.) en présence de 100µg de Iodo-gen (Pierce Chemical Co.) pendant 15 min à température ambiante. L'iode libre est séparée par gel filtration sur une colonne Sephadex G-25 PD-10 (Pharmacia). L'activité spécifique est de l'ordre de 2-3 x 10<sup>6</sup> cpm/µg.

La CyPB-N-fluorescéine est préparée en incubant 250 µg de CyPB en présence de FITC (Sigma) fraîchement dissout (10 mM dans du DMSO), à des concentrations comprises entre 50 et 200 µM, dans un tampon carbonate de sodium 0,1 M à pH 9,2, pendant 2 h à température ambiante.

La CyPB-S-fluorescéine est préparée en incubant 250 µg de CyPB en présence de 25 excès molaires en fluorescéine-5-maléimide (Pierce Chemical Co.) fraîchement dissout (25

mM dans du DMF) dans du DPBS (Dulbecco's phosphate buffer saline, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, 1 mM Mg<sup>2+</sup>) (Sigma) à pH 7,3, pendant 2 h à 22°C.

Les CyPB fluorescentes sont séparées de l'excès de réactif par gel filtration sur PD-10. Les réactions se font à l'obscurité. Le rapport fluorescéine/protéine est estimé en mesurant l'absorbance à 495 et 280 nm et calculé selon la méthode de Jobbagy & Kiraly (1966).

Le complexe CyPB/CsA (radiomarké ou non) est obtenu par incubation de la CyPB avec 10 excès molaires en CsA pendant 30 min à température ambiante. La CsA non-complexée est éliminée par chromatographie hydrophobe sur colonne Sephadex LH-20 (Spik *et al.*, 1991).

### III- Préparation des échantillons de sang

Les échantillons de sang des donneurs sains, prélevés sur citrate, proviennent de l'Etablissement de transfusion Sanguine de Lille.

Les échantillons de sang des différents patients (greffés ou souffrant de PR), traités ou non à la CsA, proviennent du CHRU de Lille. Ils sont prélevés sur EDTA. 57 patients sont traités à la CsA, dont 42 transplantés et 15 atteints de PR. 5 patients sont atteints de PR mais ne sont pas traités à la CsA. Les taux résiduels de CsA sont mesurés par le test EMIT, après deux cycles de congélation/décongélation, avec des anticorps monoclonaux de souris qui ne croisent pas avec les métabolites de la CsA. Les patients transplantés ne présentent aucun signe de rejet au moment du prélèvement.

#### A- Isolement des cellules totales (groupe UBC)

Le sang est centrifugé à 2500 g et lavé deux fois avec du RPMI pour retirer le plasma, afin d'éviter toutes variations individuelles dues aux protéines plasmatiques endogènes. Les cellules sont remises en suspension jusqu'au volume initial dans du milieu RPMI complet.

#### B- Isolement des cellules mononuclées (groupe UBC)

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont isolées par centrifugation sur un milieu de séparation (Lymphoprep, Nycomed) à 600 g pendant 30 min. Après lavages par du DPBS, les PBMC sont resuspendus soit dans du DPBS contenant 0,5% de serum-albumine bovine (DPBS-BSA) pour les analyses directes, ou dans du milieu complet RPMI pour les cultures *in vitro*. La stimulation des lymphocytes est réalisée en incubant les cellules 72 h à 37°C dans des boîtes de 96 puits, en présence d'anticorps monoclonal anti-CD3 (Immunotech) à 50 ng/ml.

Les études de fixation sur la population entière des lymphocytes circulants (PBL) sont réalisées après élimination des monocytes par adhésion sur plastique pendant 1 h à 37°C.

Le traitement membranaire des PBL par les endoglycosidases (Sigma) est réalisé par incubation des cellules ( $2 \times 10^6$  cellules/ml) avec différentes concentrations en héparinase ou chondroitinase pendant 3 h à température ambiante dans du DPBS-BSA. Les conditions optimales sont obtenues par 0,5 UI/ml d'héparinase et 10 UI/ml de chondroitinase. La digestion enzymatique est stoppée par trois lavages avec du DPBS à 4°C afin d'éliminer les enzymes.

Le traitement membranaire des PBL par les protéases (trypsine (Sigma) à 1 mg/ml ; pronase E (Merck) à 100 µg/ml) est réalisé pendant 30 min à 4°C. La réaction enzymatique est arrêtée par lavages des cellules avec du RPMI complet, les expériences de fixation sont également réalisées en présence de SVF afin d'éviter la dégradation possible des ligands par les protéases résiduelles.

### C- Isolement des cellules CyPB<sup>+</sup> et CyPB<sup>-</sup>

Les cellules CyPB<sup>+</sup> et CyPB<sup>-</sup> sont séparées par leur capacité à fixer ou non la CyPB. Pour cette séparation, une colonne d'affinité est préparée en couplant la CyPB à une matrice SulfoLink Coupling Gel (Pierce Chemical Co.) par son unique résidu de cystéine. 4 mg de CyPB (1mg/ml) sont incubés en présence de 2 ml de gel dans du tampon Tris 50 mM, EDTA 5 mM à pH 8,3 pendant 1 h à température ambiante. Après lavages de la colonne afin d'éliminer la CyPB non conjuguée, le gel est traité dans le même tampon en présence de 10 mM de cystéine, pendant 30 min afin de bloquer les groupements n'ayant pas réagi. Le gel est alors abondamment lavé par du DPBS puis remis en suspension dans du RPMI. Toutes les étapes se font dans des conditions stériles. La quantité de CyPB immobilisée sur le gel est estimée à 2 mg/ml de gel après avoir mesuré par absorbance à 280 nm la quantité de CyPB non immobilisée.

Les PBL sont alors mélangés au gel et incubés pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente. Les cellules non fixées, qui correspondent aux lymphocytes CyPB<sup>-</sup>, sont recueillis dans les surnageants de lavage par du DPBS au cours des 3 cycles décantation/resuspension du gel. Les cellules CyPB<sup>+</sup> sont décrochées du gel par lavage avec du tampon glycine 0,2 M/0,5 M NaCl pH 4 puis rapidement lavées dans du DPBS-BSA pH 7,4. La pureté des populations est vérifiée par fixation de la CyPB-S-fluorésceine.

## D- Isolement du plasma

Le plasma est obtenu par centrifugation des échantillons de sang à 2500 g pendant 20 min puis stocké à -20°C avant son utilisation.

## IV- Mise en évidence de la CyPB

### A- Dosage ELISA

Les taux de CyPB sont déterminés par ELISA selon la procédure suivante. Les anticorps polyclonaux anti-CyPB sont dilués à 10 µg/ml dans du tampon carbonate de sodium 20 mM, pH 9,6 et incubés une nuit à 4°C dans des microplaques ELISA (Nunc). Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués à 37°C pendant 1 h avec 3% de gélatine dans du PBS (100 mM phosphate de sodium, pH 7,4). Les échantillons de plasma sont dilués au 1/10 dans du PBS et la gamme de CyPB est préparée dans du PBS contenant 10% de SVF. Les échantillons sont alors incubés 2 h à 37°C. Cette étape est suivie par 2 h d'incubation à 37°C avec les anticorps anti-CyPB polyclonaux marqués à la biotine (10 µg/ml), suivie d'une seconde incubation en présence d'avidine conjuguée à la peroxydase (5 µg/ml) (Sigma) pendant 1 h à 37°C. Entre chaque étape, les puits sont lavés avec du PBS-0,05% Tween. L'absorbance est mesurée après hydrolyse de l'*o*-phénylènediamine (OPD) par la peroxydase (4 mg, 10 ml PBS-citrate pH 5,5, 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma). Cette méthode ELISA permet de mesurer la CyPB dans le plasma de patients traités à la CsA, puisqu'il a été précédemment démontré que ces anticorps polyclonaux reconnaissent la CyPB même en présence de fortes concentrations en médicament (Allain et al., 1995).

### B- Immunorévélation de la CyPB par Western Blot

Les échantillons de plasma (1ml) sont déposés sur 500 µl de gel SP Sephadex C-50 échangeuse de cations (Pharmacia), équilibrée dans du PBS pH 7,4, afin de retenir les protéines basiques. Après lavage des composants non retenus par le même tampon, les protéines basiques sont directement éluées par 100 µl de tampon d'échantillon concentré d'électrophorèse SDS-PAGE (Tris 25mM/ glycolle 200 mM/ SDS 0,1%, pH 8,6) préchauffé. Les éluats sont chauffés à 100°C pendant 2 min, séparés par électrophorèse en SDS-PAGE. Les indices de réticulation sont de 12% pour le gel de séparation (Tris-HCl, pH 8,8) et de 5% pour le gel de concentration (Tris-HCl, pH 6,8). L'électrophorèse est réalisée à 50 mA pendant 16 h. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Schleicher & Schull). Le transfert est réalisé pendant 3 h sous 250 V, dans un tampon Tris 25 mM/ glycolle 200 mM/ méthanol 20%, pH 8,4.

La membrane est ensuite bloquée par du PBS contenant 3% en gélatine pendant 1 h à température ambiante. Après lavage au PBS-0,05% Tween, la membrane est exposée pendant 2 h à température ambiante à l'anticorps monoclonal spécifique anti-CyPB (1/2000). Cette étape est suivie par une incubation en présence d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris marquée à la peroxidase (1/2000) (Pasteur diagnostic) pendant 1 h à température ambiante. La révélation est réalisée par le diaminobenzidine (DAB), substrat de l'enzyme (Kit Sigma).

## V- Etudes des interactions de la CyPB

### A- Fixation de la CyPB

#### 1- A la surface des cellules

##### *a. Cytofluorimétrie en flux*

Les cellules ( $2 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubées en présence de 100 nM de CyPB-S-fluorescéine pendant 1 h à 4°C. La fixation non-spécifique est déterminée en parallèle par l'addition de 100 excès molaires de CyPB non marquée. Après 1 h d'incubation, les cellules sont lavées et mises en suspension dans du DPBS pour l'analyse.

Une méthode de double marquage fluorescent est mise au point pour détecter la fixation de la CyPB à la surface de différentes sous-populations lymphocytaires. Comme décrit précédemment, les cellules sont incubées en présence de 100 nM en CyPB-S-fluorescéine pendant 1 h à 4°C. Les cellules exprimant le CD3, CD4, CD8, CD45RA et CD45RO sont détectées en incubant les cellules avec des anticorps de souris anti-marqueur lymphocytaire humain (Immunotech) suivis d'un anticorps anti-IgG de souris marqué à la phycoérythrine (Sigma). Les lymphocytes exprimant le CD28, CD56 ou HLA-DR sont directement détectés par des anticorps spécifiques marqués à la phycoérythrine (Dako). Toutes les incubations sont réalisées dans du DPBS-BSA pendant 1 h à 4°C et les cellules sont lavées deux fois entre chaque étape.

##### *b. Ligand radioactifs*

Les cellules ( $4 \times 10^6$  cellules/ml) sont mises en suspension dans du DPBS-BSA en présence de plusieurs concentrations en ligand radiomarqué ( $[^{125}\text{I}]\text{-CyPB}$  ou  $\text{CyPB}/[^3\text{H}]\text{-CsA}$ ). La fixation non spécifique est déterminée par incubation des cellules en présence de ligand radiomarqué et 200 excès molaires de ligand non marqué. Après 1 h d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées 3 fois par du DPBS et la radioactivité associée aux cellules (fixée) et présente dans le surnageant (libre) est mesurée.

Les sites glycaniques et non glycaniques sont discriminés par leur différence de sensibilité à la force ionique.

Les résultats sont analysés selon la méthode de Scatchard (1949) afin de déterminer les paramètres de fixation ( $K_d$  et nombre de sites/cellule).

### 2- sur héparine-Sépharose

1  $\mu\text{g}$  de ligand radiomarqué (50nM) est incubé en présence de 100  $\mu\text{l}$  de gel héparine-Sépharose (Pharmacia) pendant 1 h à température ambiante. La résistance à la force ionique est alors étudiée par élution du ligand fixé par du PBS à différentes concentrations en NaCl.

## **B- Compétition de fixation**

### 1- A la surface des cellules

Les cellules sont incubées en présence de ligands radiomarqués à 50 nM et de compétiteurs ou d'inhibiteurs de fixation potentiels. Selon les expériences, ces derniers sont :

- les dérivés de CyPB : CyPB-S-, CyPB-N-fluorésceine et complexe CyPB/CsA
- les isoformes de CyPs : CyPA et CyPC humaines recombinantes (Sandoz, Bâle) non marquées
- les peptides N- et C-terminaux
- des HBPs : protamine (Sigma), Lf (isolée du lait de femme au laboratoire) et l'IL8 humaine recombinante (R & D systems)
- des dérivés de cyclosporines : CsA, CsG et CsH
- des GAG : héparine (Roche), HS (Fluka), CS-C (Sigma), CS-A/CS-B (isolés au laboratoire) et l'acide hyaluronique (Sigma).

Après 1h d'incubation, la radioactivité associée aux cellules ou libérée dans le surnageant après les différents lavages (DPBS, PBS-NaCl 0,6 M) est comptée. La fixation résiduelle est exprimée en fonction de chaque concentration en compétiteurs ou inhibiteurs et la capacité de ces derniers à déplacer la CyPB est évaluée par la concentration nécessaire pour atteindre 50% d'inhibition de la fixation ( $CI_{50}$ ).

### 2- sur héparine-Sépharose

La [ $^{125}\text{I}$ ]-CyPB est incubée avec les différents compétiteurs en présence d'héparine-Sépharose. Après 1 h d'incubation, la radioactivité associée à la matrice est comptée.

## C- Internalisation

### 1- Incorporation de la CsA libre ou complexée

Les cellules des groupes PBMC et UBC sont incubées en présence de plusieurs concentrations en [<sup>3</sup>H]-CsA ou en complexe CyPB/[<sup>3</sup>H]-CsA pendant 1 h à 37°C. Dans les deux groupes, la radioactivité associée aux PBMC est alors mesurée, soit directement pour les cellules du groupe PBMC, soit après isolement sur Lymphoprep pour le groupe UBC. La distribution de la [<sup>3</sup>H]-CsA dans le sang est déterminée par mesure de la radioactivité présente dans le surnageant (100 µl) et dans les hématies (1 x 10<sup>8</sup> cellules).

### 2- Endocytose de la CyPB ou du complexe

Deux méthodes ont été mises au point afin d'étudier le phénomène d'endocytose de la CyPB. Dans chaque cas, la fixation et l'incorporation non spécifiques du ligand radiomarqué ont été estimés par addition de 200 excès molaires de ligand non marqué.

Dans la première méthode, les cellules (4 x 10<sup>6</sup> cellules/ml) ont été incubées à 37°C dans du RPMI-BSA. Le ligand radiomarqué est ajouté à une concentration finale de 50 nM. Aux temps indiqués, les cellules sont prélevées, lavées par du DPBS, puis traitées soit par la Pronase, pour éliminer toute la fixation membranaire, soit par du PBS citrate pH4 ou par du PBS-NaCl 0,6 M afin de discriminer les deux sites de fixation de la CyPB. Après ces différents traitements, la radioactivité associée au culot cellulaire (fraction résistante) et au surnageant (fraction sensible) est comptée.

Dans la deuxième méthode, les cellules sont incubées 1 h à 4°C en présence de 50 nM de ligands radiomarqués. Après lavage soit par du DPBS (pour éliminer le ligand non fixé), soit par du PBS-NaCl 0,6 M (pour éliminer le ligand fixé sur les sites glycaniques), les cellules sont incubées à 37°C dans du RPMI-BSA. A différents temps, les cellules sont prélevées et le surnageant d'incubation est précipité par 10% d'ATCA afin de séparer la CyPB intacte (acido-précipité) du ligand dégradé (acido-soluble). Les cellules sont ensuite traitées soit par la Pronase, soit par du tampon glycine 20 mM/ NaCl 100 mM pH4 pendant 10 min. La radioactivité est alors comptée comme précédemment dans le surnageant (fraction sensible) et le culot cellulaire (fraction résistante).

## VI- Etude des propriétés biologiques

### A- Flux calcique

Les cellules (2 x 10<sup>6</sup>) sont incubées en présence de 5 µM de Fluo-3 acetoxyethyl ester (Molecular Probes, Holland) dans 600 µl de PBS pendant 1 h à température ambiante.

Après lavage, les cellules chargées en Fluo-3 sont stimulées à 37°C par les différents ligands (CyPB, CsA et complexe CyPB/CsA) dans différents tampons (DPBS, PBS-EGTA 2 mM). Aux temps indiqués, les changements de fluorescence reflétant les variations de la concentration cytosolique en Ca<sup>2+</sup> sont suivis par cytofluorimétrie en flux. La concentration en Ca<sup>2+</sup> cytosolique exprimée en µM est calculée en appliquant la formule suivante :

$$[Ca^{2+}] = [Fluorescence - Fluorescence\ mini] / [Fluorescence\ maxi - Fluorescence] \times Kd$$

Le maximum de fluorescence est obtenue par addition de 2 µM d'ionomycine et le minimum est mesuré lorsque les cellules sont préincubées dans du tampon PBS-EGTA en absence de ligand. L'affinité du Fluo-3 (Kd) pour le Ca<sup>2+</sup> libre est de 0,4 µM (Minta *et al.*, 1989).

## B- Analyse des dérivés inositol-phosphates (IP)

Les cellules (1 x 10<sup>6</sup> cellules/ml) ont été incubées avec 5 µCi/ml de [<sup>3</sup>H]-*myo*inositol pendant 24 h à 37°C. 10 min avant la stimulation par le ligand, les cellules en suspension sont incubées en présence de 15 mM de LiCl afin d'éviter la déphosphorylation de différents dérivés IP et la formation d'inositol. A t = 0, les cellules sont stimulées par la CyPB. Aux différents temps, les cellules sont collectées (1 ml) et déposées sur 1 ml du mélange chloroforme/méthanol/HCl 1M (50v/50v/1v). Après agitation, 0,5 ml de chloroforme est ajouté. Les échantillons sont centrifugés à 800g pendant 10 min à 4°C et la phase aqueuse supérieure contenant les phosphates-<sup>3</sup>H-inositol est récupérée. Les phosphates-<sup>3</sup>H-inositol sont séparés sur résine échangeuse d'anion Dowex 1 X 8 équilibrée sous forme formate (1 ml). Le protocole d'élution est le suivant :

- 2 x 5 ml d'eau pour éliminer les inositols libres
- 2 x 5 ml de formate d'ammonium 60 mM / tetraborate d'ammonim 5 mM pour exclure les glycerophosphate-inositols
- 10 x 1 ml de formate d'ammonium 0,2 M / acide formique 0,1 M pour récupérer les inositol monophosphate
- 10 x 1 ml de formate d'ammonium 0,45 M / acide formique 0,1 M pour les inositol bisphosphates
- 10 x 1 ml de formate d'ammonium 1 M / acide formique 0,1 M pour les inositol trisphosphate.

La radioactivité dans ces différents éluats est ensuite comptée.

## C- Analyse de l'activité immunosuppressive de la CsA et du complexe CyPB/CsA

Les PBMC des groupes PBMC et UBC ou les lymphocytes CyPB<sup>+</sup> et CyPB<sup>-</sup> sont respectivement activés pendant 72 h en présence d'anticorps anti-CD3 (soit en suspension (50 ng/ml), soit préalablement adsorbés sur la plaque (10 µg/ml)). Les cellules (1 x 10<sup>6</sup> cellules/ml) sont incubées dans des boîtes de 96 puits en absence ou en présence de différentes concentrations en CsA libre ou complexée à la CyPB comprises entre 6 et 1000 ng/ml. La prolifération des lymphocytes est mesurée par incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans les cellules. La [<sup>3</sup>H]-thymidine (5 µCi/ml) est ajoutée à la suspension des lymphocytes en prolifération pendant les cinq dernières heures de culture. Les cellules sont alors collectées et déposées sur filtre 0,22 µm. Après lavage par aspiration douce, les cellules sont lysées par 10% d'ATCA. Les filtres sont ensuite rincés en présence de NaOH 0,1 M puis séchés à l'éthanol. Les filtres sont alors placés dans du liquide à scintillation pour phase solide et la radioactivité précipitée est comptée. Les résultats sont exprimés en index de prolifération : 100% correspond à la prolifération obtenue en absence de médicament. Les DI<sub>50</sub> (Dose inhibitrice à 50%) sont estimées à partir des courbes dose-réponse ajustées.

## VII- Analyse

### A- Mesure de la radioactivité

- Les rayonnements  $\gamma$  libérés par la [<sup>125</sup>I]-CyPB associée aux cellules ou présente dans les surnageants sont directement mesurés en utilisant le compteur Compugamma LKB Wallac modèle 1282.

- Les rayonnements  $\beta$  libérés par les différents dérivés tritiés ou marqués au <sup>14</sup>C sont mesurés dans les surnageants et/ou dans les cellules après lyse par NaOH 0,1 M. Les échantillons sont alors mélangés dans du liquide à scintillation (pour phase solide ou liquide) puis comptés avec le compteur Beckman modèle LS 6000TA.

### B- Mesure par cytofluorimétrie en flux

La fluorescence émise par les cellules est analysée à l'aide d'un cytofluorimètre en flux (Becton Dickinson) équipé d'un laser émettant à 488 nm et d'un filtre à bande passante étroite centré soit sur 530 nm, ou sur 575 nm, permettant la détection des fluorescences verte et rouge. Chaque cellule, après interception de la lumière incidente, émet ou diffuse un certain nombre de signaux :

- la lumière diffusée sous un petit angle par rapport au rayon incident, dont l'intensité est corrélée avec la taille de la cellule (forward scatter, FSC)
- la lumière diffusée à un angle droit qui est corrélée à l'importance du noyau et des inclusions cytoplasmiques dans la cellule (side scatter, SSC).
- l'intensité de fluorescence verte (FL1)
- l'intensité de fluorescence rouge (FL2).

Sur les cytogrammes, les paramètres FSC et SSC permettent de visualiser les cellules en fonction de leur taille et de leur granulométrie, et de sélectionner des régions contenant les cellules à étudier. Un nombre défini de particules fluorescentes dans la région choisie sont analysées pour les expériences de fixation et pour les expériences de mesure du flux calcique. Les signaux sont transformés en données numériques et un traitement informatique (PC-Lysis, Becton-Dickinson) permet la visualisation des résultats sous forme d'histogrammes (nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence) ou de cytogrammes (représentation simultanée des deux fluorescences). Sur les histogrammes de fluorescence, la surface du pic de fluorescence est proportionnelle au pourcentage de cellules fluorescentes, alors que la position du pic sur l'échelle de l'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre de molécules fluorescentes par cellule. La fluorescence spécifique est exprimée par la  $\Delta FMV$  qui correspond à la variation de fluorescence de l'échantillon par rapport au témoin.

$$\Delta FMV = \{[\text{fluor. moy. de l'échantillon} - \text{fluor. moy. du témoin}] / \text{fluor. moy. du témoin}\} \times 100$$

### C- Analyses statistiques

Les valeurs indiquées sont des moyennes  $\pm$  S.D. d'expériences indépendantes. Afin d'éviter de surcharger certains graphes, les écarts types n'ont pas été représentés. La signification statistique est analysée avec un Student's *t* test pour des données non appariées. Les valeurs de  $P < 0,05$  sont considérées comme significatives. Le test de Wilcoxon signed-rank est utilisé pour des données appariées. Les coefficients de corrélation sont analysés par le coefficient de corrélation Spearman rank.

*Annexe*

---

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

(Received for publication, December 20, 1993, and in revised form, March 15, 1994)

Fabrice Allain, Agnès Denys, and Geneviève Spik†

From the Laboratoire de Chimie Biologique,  
Université des Sciences et Technologies de Lille,  
Unité Mixte de Recherche 111, CNRS,  
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

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)<sup>1</sup> (1, 2). They are also termed peptidylprolyl *cis-trans*-isomerases, 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 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),

\* This investigation was supported in part by CNRS Unité Mixte de Recherche 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 BMH1-CT93-1748). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† To whom correspondence should be addressed: 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.

<sup>1</sup> 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.

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.<sup>2</sup> 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 lines were obtained from the Institut Pasteur (Lille, France), and Raji B-cell line was obtained from the Centre Régional de Transfusion Sanguine (Lille, France). 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 NaHCO<sub>3</sub>, gentamycin (5 µg/ml), pH 7.3, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Cultures were diluted every 2 days, in order to maintain cell concentration from 0.5 to 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml.

**Preparation of <sup>125</sup>I-CyPB**—<sup>125</sup>I-CyPB was obtained by incubating 100 µg of protein with 0.3 mCi of carrier-free Na<sup>125</sup>I (Amersham Corp.) in presence of 100 µg of Iodo-Gen (Pierce Chemical 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 × 10<sup>6</sup> 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

<sup>2</sup> F. Allain, C. Boutillon, C. Mariller, and G. Spik, submitted for publication.

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  $400 \times g$ , 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  $10^6$  cells/ml. Cells ( $10^6$ /sample) were incubated in presence of various CyPB concentrations for 1 h at  $4^\circ\text{C}$  and rapidly washed three times in DPBS. The pellets were resuspended in DPBS-BSA added with anti-CyPB antibodies (1/1000) for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ . After a wash, fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (1/80) (Sigma) was added to the cell suspension for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . 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  $^{125}\text{I}$ -CyPB**—Cells were washed twice as above and diluted in DPBS-BSA to a final concentration of  $4 \times 10^6$  cells/ml. They were incubated in polyethylene tubes ( $2 \times 10^6$  cells/sample) for 1 h at  $4^\circ\text{C}$  with various concentrations of  $^{125}\text{I}$ -CyPB. Nonspecific binding was determined in parallel experiments in the presence of a 500-fold molar excess of unlabeled CyPB. After incubation, cells were centrifuged ( $400 \times g$ , 5 min) and washed three times with 3 ml of cold DPBS. Cell-associated radioactivity was measured using a model 1282 Compugamma LKB-Wallac counter. Nonspecific binding was subtracted from total counts to determine specific binding.

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

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

In the first method, cells were allowed to bind  $^{125}\text{I}$ -CyPB for various times at  $4^\circ\text{C}$  or  $37^\circ\text{C}$ . After washing off excess unbound CyPB, cells were resuspended in 1 ml of ice-cold DPBS containing 0.01% Pronase E (Merck) for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . 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  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  and then allowed to bind  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ , or directly incubated in the presence of radioiodinated ligand in the same conditions. After a wash, cells were resuspended in prewarmed binding medium at  $37^\circ\text{C}$ . At various times, aliquots of cell suspension were removed and all subsequent steps were performed at  $4^\circ\text{C}$ . Cell-free supernatants were collected and cells were treated with Pronase as described above. The surface-bound, internalized, and released  $^{125}\text{I}$ -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  $4^\circ\text{C}$ , and centrifuged 30 min at  $10,000 \times g$ ; the intact and degraded  $^{125}\text{I}$ -CyPB were counted in precipitated and soluble extracts, respectively.

For all experiments, nonspecific binding was determined as described above.

## RESULTS

**Surface Binding of CyPB**—The binding of CyPB to Jurkat T-cells was first investigated by flow cytofluorimetry, 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

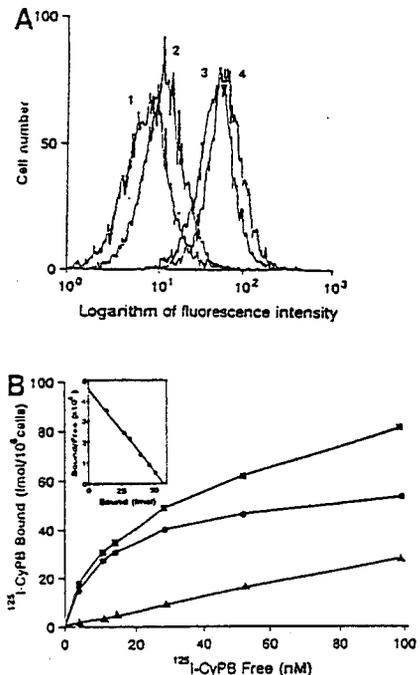


FIG. 1. Surface binding of CyPB to Jurkat T-cells. Panel A, surface binding of CyPB analyzed by flow cytofluorimetry. Cells ( $10^6$ /ml) were allowed to bind CyPB for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ . After a wash, surface-bound ligand was detected by using an indirect double-antibody method, as described 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  $^{125}\text{I}$ -CyPB. Dose dependence and saturation of CyPB binding were studied by incubating cells ( $4 \times 10^6$ /ml) for 1 h at  $4^\circ\text{C}$  with the indicated concentrations of radiolabeled CyPB. The specific binding ( $\bullet$ ) was obtained after subtraction of the nonspecific ( $\blacktriangle$ ) from total counts ( $\blacksquare$ ). Points represent the mean values of triplicate at each ligand concentration. Inset is the Scatchard plot of the binding data.

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  $12 \pm 2$  nM, and the number of binding sites was estimated to  $35,000 \pm 1700$ /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  $^{125}\text{I}$ -CyPB in the presence of unlabeled CyPB or CsA-complexed CyPB.  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding was specifically inhibited by 45 and 65% in presence of 100 and 1,000 molar excesses of unlabeled CyPB, respectively. On the other

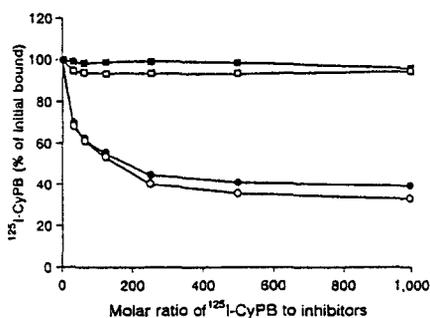


Fig. 2. Competitive <sup>125</sup>I-CyPB binding experiments to Jurkat T-cells. Competitive binding experiments were performed by incubating cells in presence of 50 nM <sup>125</sup>I-CyPB and either unlabeled CyPB (●), CyPA (■), CsA-CyPB complex (○), or lysozyme (□) at the indicated molar excesses.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

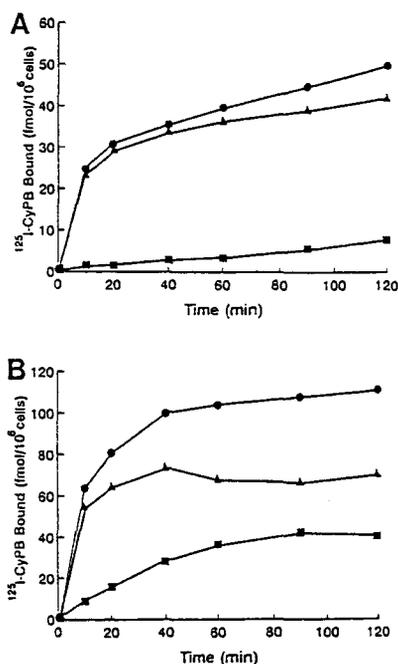


Fig. 3. Time course of membrane binding and internalization of <sup>125</sup>I-CyPB in Jurkat T-cells. Cells ( $4 \times 10^6$ /ml) were incubated with 50 nM of <sup>125</sup>I-CyPB at either 4 °C (A) or 37 °C (B). At the indicated times, cells were washed and treated with Pronase as described under "Experimental Procedures." Surface-bound (▲) and internalized (■) <sup>125</sup>I-CyPB were measured in eluates from Pronase-treated cells and in cellular pellets, respectively. Total cell-associated CyPB (●) 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 nonspecific binding.

hand, CsA-complexed CyPB inhibited <sup>125</sup>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 <sup>125</sup>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 in-

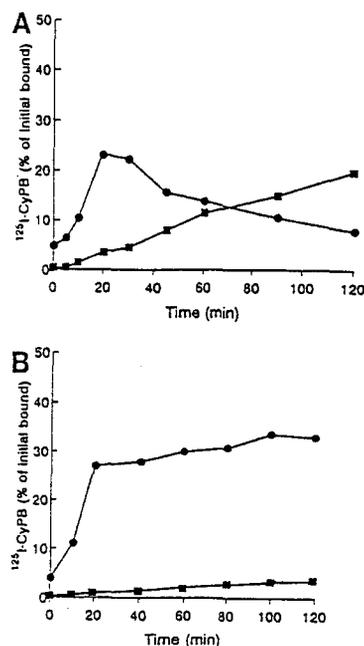


Fig. 4. Time course of the fate of <sup>125</sup>I-CyPB surface-bound to the Jurkat T-cells. Both control-treated (A) and chloroquine-treated (B) cells were incubated with 50 nM of <sup>125</sup>I-CyPB for 1 h at 4 °C. After washing off the unbound ligand, cells were allowed to internalize <sup>125</sup>I-CyPB at 37 °C. At indicated times, aliquots were removed and incubation supernatants, eluates from Pronase-treated cells, and cell pellet 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 (■).

ternalized 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 <sup>125</sup>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 <sup>125</sup>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 was counted at various times. During the first 5 min, the Pronase-sensitive fraction decreased rapidly and <sup>125</sup>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 <sup>125</sup>I-CyPB started to appear in the incubation medium (Fig. 4A). The lysosomo-

tropic 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 quite 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<sup>2+</sup> 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 cytokine-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

- Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. (1984) *Science* 226, 544–547
- Harding, M. W., Handschumacher, R. E., and Speicher, D. W. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 8547–8555
- Fisher, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F. X. (1989) *Nature* 337, 476–478
- 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
- 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
- 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., Pritchett, W. P., Bossard, M. J., Brandt, M., and Levy, M. A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 23204–23214
- Hasei, K. W., Glass, J. R., Godbout, M., and Sutcliffe, J. G. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 3484–3491
- Arber, S., Krause, K. H., and Caroni, P. (1992) *J. Cell Biol.* 116, 113–125
- Inoue, T., Yoshida, Y., Isaka, Y., and Tagawa, K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 857–863
- 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
- Ryffel, B., Woerly, G., Greiner, B., Haendler, B., Mihatsch, M. J., and Foxwell, M. J. (1991) *Immunology* 72, 399–404
- Xu, Q., Leiva, M. C., Fischkoff, S. A., Handschumacher, R. E., and Lyttle, C. R. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 11968–11971
- Davis, T. R., Tabatabai, L., Bruns, K., Hamilton, R. T., and Nilsen-Hamilton, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1095, 145–152
- Sherry, B., Yarett, N., Strupp, A., and Cerami, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 3511–3515
- Caroni, P., Rothenfluh, A., McGlynn, E., and Schneider, C. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 10739–10742
- Yang, S. Y., Chovaito, S., and Dupont, B. (1986) *J. Immunol.* 137, 1097–1100
- Vaitukaitis, J., Robbins, J. B., Nieschlag, E., and Ross, G. T. (1971) *J. Clin. Endocrinol.* 33, 988–991
- Friedman, J., and Weissman, I. (1991) *Cell* 66, 799–806
- Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V., and Goff, S. P. (1993) *Cell* 73, 1067–1078
- Emmel, E. A., Verweij, C. L., Durand, D. B., Higgins, K. M., Lacy, E., and Crabtree, G. R. (1989) *Science* 246, 1617–1620
- Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991) *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) *Biochemistry* 31, 3896–3901
- Schreiber, S. L. (1992) *Cell* 70, 365–368
- Sander, B., Brigati, C., and Möller, E. (1986) *Scand. J. Immunol.* 23, 435–440
- Povlsen, J. V., Rasmussen, A., Madsen, M., and Lamm, L. U. (1990) *Scand. J. Immunol.* 32, 45–51
- Cacalano, N. A., Chen, B. X., Cleveland, W. L., and Erlanger, B. F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4353–4357

## Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through the specific binding of complexed drug to the cell surface

Fabrice ALLAIN, Agnès DENYS and Geneviève SPIK\*

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du Centre National de Recherche Scientifique no. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Cyclophilin B (CyPB) is a cyclosporin A (CsA)-binding protein located within intracellular vesicles and released in biological fluids. We recently reported the specific binding of this protein to T-cell surface receptor which is internalized even in the presence of CsA. These results suggest that CyPB might target the drug to lymphocytes and consequently modify its activity. To verify this hypothesis, we have first investigated the binding capacity and internalization of the CsA–CyPB complex in human peripheral blood T-lymphocytes and secondly compared the inhibitory effect of both free and CyPB-complexed CsA on the CD3-induced activation and proliferation of T-cells. Here, we present evidence that both the CsA–CyPB complex and free CyPB bind

to the T-lymphocyte surface, with similar values of  $K_d$  and number of sites. At 37 °C, the complex is internalized but, in contrast to the protein, the drug is accumulated within the cell. Moreover, CyPB receptors are internalized together with the ligand and rapidly recycled to the cell surface. Finally, we demonstrate that CyPB-complexed CsA remains as efficient as uncomplexed CsA and that CyPB enhances the immunosuppressive activity of the drug. Taken together, our results support the hypothesis that surface CyPB receptors may be related to the selective and variable action of CsA, through specific binding and targeting of the CyPB–CsA complex to peripheral blood T-lymphocytes.

### INTRODUCTION

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 immunosuppressant drug cyclosporin A (CsA) specifically binds to cyclophilins and abolishes the enzymic 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 specific receptor was found to bind to the phosphatase calcineurin, leading to the inhibition of enzymic activity [8]. The formation of a such ternary complex is thought to be a crucial step, which effectively blocks the early T-cell activation cascade and constitutes the basis 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 understanding of the mechanisms involved in cell susceptibility to CsA is very important for the optimization of 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. The presence of a surface receptor for CsA remains controversial [14,15]. We have recently reported the characterization of T-cell surface binding sites for cyclophilin B (CyPB) [16]. This cyclophilin isoform was found to be located in reticulum vesicles [17,18] and released into biological fluids such 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 cellular concentration.

To check this hypothesis, we have investigated the role of CyPB in specific CsA incorporation into T-cells. In our previous work, we have shown 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 the presence of CsA, and subsequently released into 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 radiolabelled probe. We have then investigated the inhibitory effect of the complex on CD3-induced activation and proliferation and shown that the immunosuppressive activity of CsA was enhanced 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.

Abbreviations used: CsA, cyclosporin A; CyPA, cyclophilin A; CyPB, cyclophilin B; DPBS, Dulbecco's PBS; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells.

\* To whom correspondence should be addressed.

## EXPERIMENTAL

### Materials

[<sup>3</sup>H]CsA (10.1 Ci/mmol) was a generous gift from Sandoz-France (Rueil-Malmaison, France). It was diluted in ethanol at a concentration of 250  $\mu$ Ci/ml. Recombinant CyPB was produced in collaboration with the Lycée Valentine Labbé (La Madeleine, France) and purified as previously described [19]. 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, Paisley, Scotland, U.K.) containing 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, and gentamicin (5  $\mu$ g/ml), pH 7.3, supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum.

### Preparation of radiolabelled ligands

[<sup>3</sup>H]CsA-CyPB complex was obtained by incubating 100  $\mu$ g of CyPB with a 10-fold molar excess of [<sup>3</sup>H]CsA for 30 min at room temperature. Free CsA was removed by hydrophobic chromatography on a Sephadex LH-20 column (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, U.S.A.) [19]. The specific radioactivity was estimated to be (0.8–1)  $\times 10^6$  c.p.m./ $\mu$ g of CyPB. The stability of the complex was then verified at 4 °C and at 37 °C, and dissociated [<sup>3</sup>H]CsA never exceeded 5% of total radioactivity in our control. Moreover, the complex remained intact in citrate and phosphate buffers over the pH range from 4 to 9. <sup>125</sup>I-CyPB was obtained as previously described [16]. The specific radioactivity ranged over (4–6)  $\times 10^6$  c.p.m./ $\mu$ g.

### Surface binding assay

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were first isolated by density-gradient centrifugation on Lymphoprep separation medium (Nycomed, Oslo, Norway). T-lymphocytes were collected after depletion of monocytes and B-cells, as described in [21]. The purity of the population and the cell viability were estimated by flow cytometry analysis (FACScan Cytometer, Becton Dickinson). Cells were then resuspended in cold Dulbecco's PBS (DPBS) (Sigma) supplemented with 0.5% BSA, to a final density of 4  $\times 10^6$  cells/ml, and allowed to bind either [<sup>3</sup>H]CsA-CyPB complex or <sup>125</sup>I-CyPB at various concentrations, for 1 h at 4 °C. Incubation (2  $\times 10^6$  cells/sample) was performed in polyethylene tubes in order to limit non-specific adsorption of the ligand to the support. Non-specific binding was determined in the presence of a 200-fold molar excess of unlabelled ligand. After incubation, cells were centrifuged (400 g, 5 min), washed three times with 4 ml of cold DPBS and lysed by 100  $\mu$ l of 0.1 M NaOH. In the [<sup>3</sup>H]CsA-CyPB complex binding assay, cell lysates and aliquots of binding medium (50  $\mu$ 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 <sup>125</sup>I-CyPB, cell pellets and incubation medium aliquots were directly counted using a model 1282 Compugamma LKB-Wallac counter.

### Internalization kinetics

Cells (4  $\times 10^6$ /ml) were first allowed to bind either <sup>125</sup>I-CyPB or [<sup>3</sup>H]CsA-CyPB for 1 h at 4 °C, until the binding site capacity reached a steady state. After washing off excess ligand, cells were resuspended in prewarmed 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.

### Recycling of CyPB surface binding sites

Protein synthesis was inhibited by incubating cells with cycloheximide (20  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37 °C and during the remainder of the incubation. Treated cells were first incubated in the absence or presence of 50 nM unlabelled CyPB in culture medium at 37 °C. At various times, aliquots were collected and submitted to mild acid treatment to remove any remaining surface-bound ligand. After neutralizing by thoroughly washing with assay medium, specific <sup>125</sup>I-CyPB binding was determined.

### Analysis of CsA immunosuppressive activity

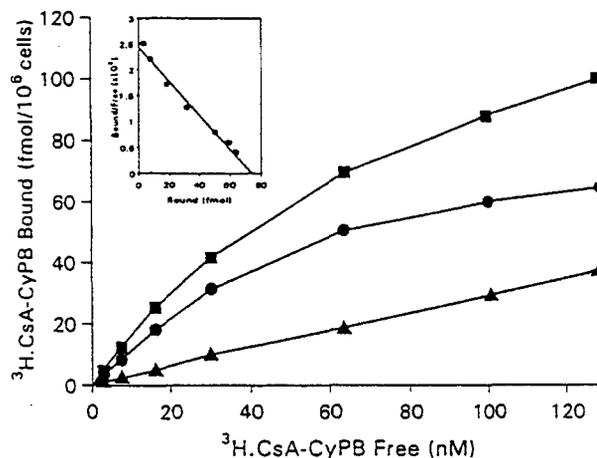
PBMCs were collected as above and resuspended in RPMI 1640 medium (10<sup>6</sup> cells/ml), containing 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, and gentamicin (5  $\mu$ g/ml), pH 7.3, and supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal-calf serum. Cells were stimulated for 72 h in a 96-well plate in the presence of a monoclonal anti-CD3 antibody (Immunotech, Marseille France), at 50 ng/ml. Lymphocyte activation was visualized by quantifying the expression of CD25 by flow cytometry. Briefly, cells were resuspended in cold DPBS-0.5% BSA (10<sup>6</sup> cells/ml) and incubated in the presence of a monoclonal rat anti-CD25 antibody (Immunotech) for 1 h at 4 °C. After washing, a second fluorescein-conjugated anti-(rat IgG) antibody (Sigma) was added for 1 h. Cells were gated for forward- and side-angle scatters and data were expressed as the variation of fluorescence mean value with non-activated cells as a control. Cell proliferation was investigated by measuring the incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine (18.5 kBq per well) for 5 h before harvesting. Results are expressed as an index of proliferation; 100% represents the proliferation obtained in the absence of the drug. The half-inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was determined by incubating cells in the presence of increasing concentrations of free CsA and CyPB-complexed CsA from 12.5 to 1000 ng/ml. Analysis between the index of proliferation and CsA doses allowed us to estimate IC<sub>50</sub> from the adjusted dose-response curve.

## RESULTS

### Binding of CyPB-CsA complex to human T-lymphocytes

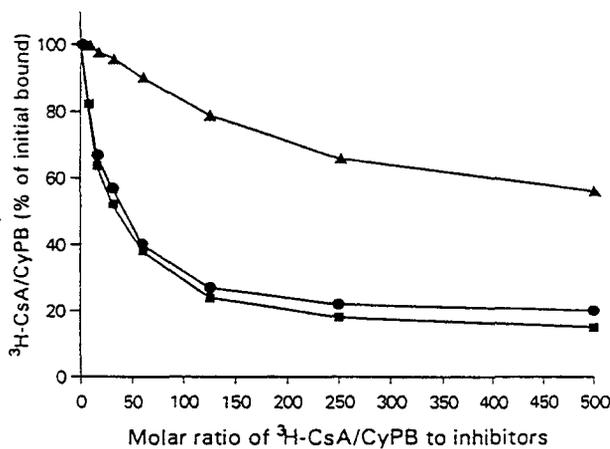
CsA is known to enter blood cells in a non-specific manner and almost 60% of the drug is recovered in the erythrocytes. The fact that CyPB could specifically bind to T-lymphocytes and mediate the incorporation of the drug into these cells suggests an interesting pathway for selective targeting of the drug to sensitive cells. To verify this hypothesis, the binding of both CyPB and CyPB-CsA complex to human blood T-lymphocytes was investigated.

The binding capacity of the CyPB-CsA complex to peripheral blood T-lymphocytes was investigated by using [<sup>3</sup>H]CsA. Cells were allowed to bind various concentrations of [<sup>3</sup>H]CsA-CyPB. The complex binding was specific since a 200-fold molar excess of unlabelled ligand inhibited [<sup>3</sup>H]CsA-CyPB binding from 60 to 80%. After subtraction of non-specific interactions from total counts, the binding was found to be concentration-dependent and saturable (Figure 1). Scatchard analysis resulted in a linear plot compatible with a single affinity site (Figure 1, inset) and



**Figure 1** Surface binding of CsA-CyPB to human peripheral blood T-lymphocytes

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

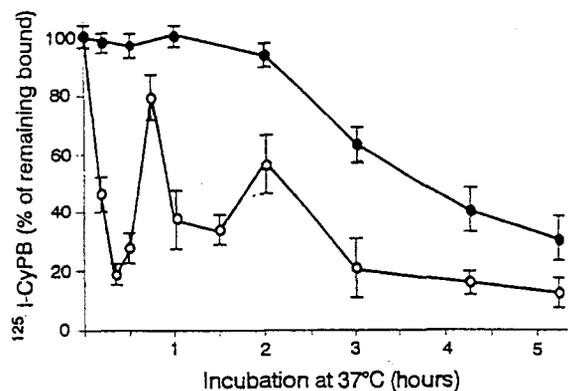


**Figure 2** Competitive experiments for CsA-CyPB binding to human peripheral blood T-lymphocytes

Competitive binding experiments were performed by incubating T-cells in the presence of 50 nM of [ $^3\text{H}$ ]CsA-CyPB and either unlabelled complex (●), uncomplexed CyPB (■) or free CsA (▲) at the indicated molar excesses. After 1 h at 4 °C, cells were washed and remaining cell-surface radioactivity was counted. Points represent the mean values of triplicates at each ligand concentration.

allowed us to determine the binding parameters, expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. from three separate experiments. The apparent dissociation constant ( $K_d$ ) was  $31 \pm 9$  nM and the number of binding sites was estimated to be  $40\,600 \pm 7600$  per cell.

Radio-iodinated 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 35000/cell [16]. Similar experiments were reproduced with the radio-iodinated ligand, in order to compare the binding parameters of both free and CsA-complexed CyPB to peripheral blood T-lymphocytes and Jurkat T-cells. The parameters of  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding to Jurkat T-cells were very



**Figure 3** Ligand-dependent internalization and recycling of CyPB-binding sites in human peripheral blood T-lymphocytes

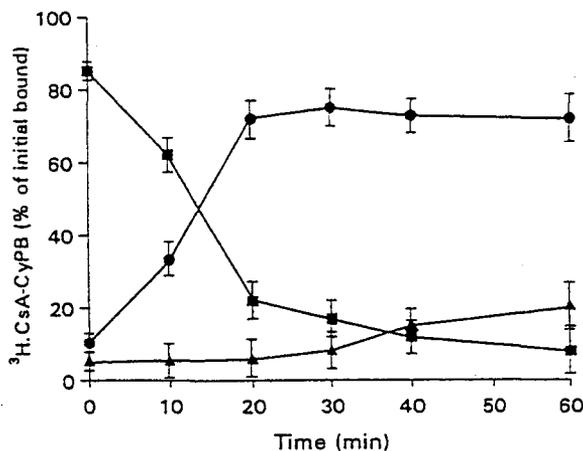
Cells were treated with cycloheximide and incubated at 37 °C in the absence (●) or presence of 50 nM CyPB (○). After being washed at the indicated times with acid buffer to remove surface-bound ligand, cells were allowed to bind  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at 4 °C. Data represent the percentages of remaining surface-bound  $^{125}\text{I}$ -CyPB in comparison with control cells, and are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. from three separate experiments.

similar to those obtained with peripheral blood T-lymphocyte ( $K_d = 18 \pm 3$  nM;  $n = 40\,300 \pm 5800$ ), suggesting that the CyPB surface binding sites were probably identical membrane protein in both cell types. Since we have shown that the CyPB-CsA complex inhibited  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding to T-cells to the same extent as the uncomplexed protein, it may be postulated that CyPB and CsA-CyPB bind specifically to the same sites on the T-cell membrane. To verify this hypothesis, we also investigated the binding of the CyPB-CsA complex to the Jurkat T-cell surface. The parameters of complex binding were similar for both peripheral blood T-lymphocytes and Jurkat T-cells, and  $K_d$  and the number of sites were slightly higher than those obtained with  $^{125}\text{I}$ -CyPB. These differences could, however, be due to the lower sensitivity in the binding assay using the tritiated complex instead of a radio-iodinated protein.

Finally, we verified the competitive properties of free CyPB and uncomplexed CsA for the inhibition of complex binding to the cell surface (Figure 2). As expected, free CyPB inhibited [ $^3\text{H}$ ]CsA-CyPB binding to T-cells to the same extent as the unlabelled complex. In contrast, a large molar excess of CsA only weakly reduced surface-bound complex. This reduction could be explained by an isotopic dilution of tritiated drug rather than by specific competition for binding to the cell surface.

#### Ligand-dependent internalization and recycling of CyPB binding sites

In a previous study, we have demonstrated that surface-bound CyPB was internalized in Jurkat T-cells and subsequently released into the medium in a degraded form [16]. These experiments were reproduced here with peripheral blood T-lymphocytes and similar conclusions may be drawn (results not shown). In addition, we studied the ligand-dependent down-regulation of CyPB binding sites (Figure 3). Cycloheximide treatment gradually decreased the surface binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB, suggesting that the binding sites are replaced on the cell surface with a half-life of 3 h 45 min. In contrast, the exposure of cycloheximide-treated T-cells to exogenous CyPB produced an almost complete loss of cell surface binding in the first few minutes. Nevertheless, cell surface binding recovered approx. 80% of the original level in 45 min.



**Figure 4** Time-course of the fate of CsA-CyPB surface-bound to human peripheral blood T-lymphocytes

Cells were first incubated with 50 nM [ $^3\text{H}$ ]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 the 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 (▲). Data are mean values  $\pm$  S.E.M. from three separate experiments.

before CyPB binding sites started a new cycle of endocytosis. These results demonstrate that CyPB binding sites are internalized in the presence of ligand and subsequently recycled to the cell surface. Similar experiments were performed in the presence of CsA without any alteration in CyPB endocytosis and binding site recycling, suggesting that the CyPB-complexed drug might be incorporated into T-lymphocytes through the internalization of the CsA-CyPB complex.

#### Internalization of CyPB-CsA complex within peripheral blood T-lymphocytes

To study whether the binding of the CsA-CyPB complex might promote drug incorporation, cells were allowed to bind [ $^3\text{H}$ ]CsA-CyPB. After washing off the excess of unbound ligand, cells were incubated at 37 °C and the distribution of surface-bound, internalized and released radioactivity was analysed after a mild-acid wash (Figure 4). During the first few minutes, the acid-sensitive fraction decreased rapidly. At the same time, the acid-resistant fraction increased, until reaching a steady state after 20 min of incubation. No significant amount of radioactivity was found in the supernatant, demonstrating that 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 the cell surface, but in contrast to the protein which is released into the supernatant in a degraded form, the drug accumulated within the cells. To confirm the involvement of CyPB binding sites in mediating CsA incorporation, similar experiments were performed in the presence of surface-trypsinated lymphocytes (results not shown). Neither specific binding of the [ $^3\text{H}$ ]CsA-CyPB complex nor significant incorporation of the drug was observed, implying the existence of a membrane protein necessary for CyPB-mediated incorporation of CsA in T-lymphocytes.

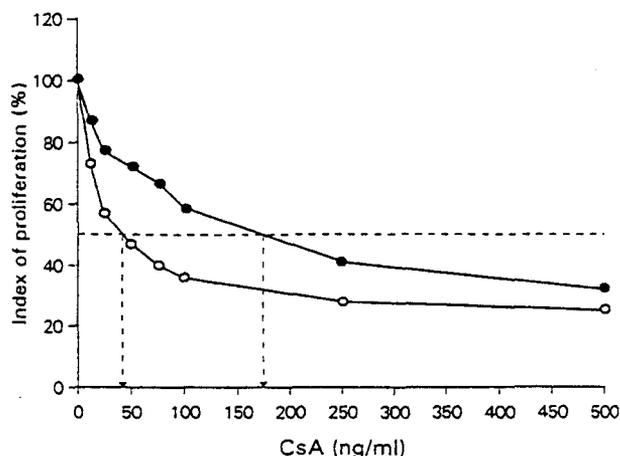
**Table 1** Effect of CyPB on CsA immunosuppressive activity

Lymphocytes were stimulated for 72 h by a monoclonal anti-CD3 antibody, in the presence of either CsA, CsA-CyPB complex or CyPB at 25 nM or 250 nM. T-cell activation and proliferation were visualized by variations of fluorescence mean value (FMV) associated with CD25 expression and by [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation experiments respectively, as described in the Experimental section. Data represent the percentages of remaining CD3-stimulation in comparison with control obtained in the absence of CsA and/or CyPB. They are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. from three separate representative experiments.

	CD25 expression (% FMV)	[ $^3\text{H}$ ]Thymidine incorporation (%)
Control	100 $\pm$ 9	100 $\pm$ 11
Free CsA		
25 nM	28 $\pm$ 5	45 $\pm$ 9
250 nM	12 $\pm$ 2	21 $\pm$ 4
CyPB-CsA complex		
25 nM	26 $\pm$ 2	31 $\pm$ 11
250 nM	12 $\pm$ 1	14 $\pm$ 7
Uncomplexed CyPB		
25 nM	80 $\pm$ 11	95 $\pm$ 16
250 nM	78 $\pm$ 8	98 $\pm$ 7

#### Immunosuppressive activity of CyPB-complexed CsA

In the following experiments, we verified the immunosuppressive activity of CyPB-complexed CsA. Indeed, the internalization of CyPB-CsA might lead to the sequestration of the drug in a subcellular compartment preventing the expression of its immunosuppressive activity. Two concentrations, 25 and 250 nM, were studied as they are respectively close to the  $K_{1/2}$  value and to saturation of CyPB-binding-site capacity. The effects of both CyPB-complexed CsA and free CsA on the anti-CD3 mixed-lymphocyte reaction were then compared. Thus, CyPB-complexed CsA inhibited CD25 expression to the same extent as free CsA without any significant variation. No significant effect was observed in the presence of uncomplexed CyPB, demonstrating that the protein had no inhibitory properties on the CD3-dependent activation of T-lymphocytes (Table 1). Cytochrome analysis of the lymphocyte population shifting from the resting T-cell region to the activated window allowed us to determine an index of activation with similar conclusions (results not shown). Cell proliferation was then studied by [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation experiments. Results were very similar for both free and CyPB-complexed CsA, suggesting that the CyPB-complexed CsA exhibits anti-proliferative properties to the same extent as free CsA. The immunosuppressive effect of the CsA-CyPB complex is likely to be due to the internalization of complexed drug. Indeed a 200-fold excess of free CyPB dramatically reduced the inhibitory effect of CsA-CyPB, demonstrating binding-site occupancy on the T-lymphocytes blocked the incorporation and the consequent activity of CyPB-complexed CsA (results not shown). Finally, we investigated the influence of CyPB on the dose-response to CsA (Figure 5). The drug concentrations required for 50% inhibition of T-cell proliferation showed marked differences, since  $\text{IC}_{50}$  was estimated to be  $40 \pm 12$  ng/ml in the presence of CyPB-complexed CsA while it was  $175 \pm 40$  ng/ml in the presence of free drug. Taken together, these results demonstrate that CyPB-mediated incorporation of CsA enhances the activity of immunosuppressive drug, suggesting it might be related to differences in lymphocyte sensitivity.



**Figure 5** Half-inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) for lymphocyte CD3-induced proliferation in the presence of free and CyPB-complexed CsA

Representative dose-response curves were determined by [ $^3H$ ]thymidine incorporation in CD3-stimulated lymphocytes exposed to increasing concentrations of either free CsA (●) or CyPB-complexed drug (○). The half-inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were determined from the adjusted dose-response curves between index of proliferation and CsA concentrations. Data are mean values from three separate experiments.

## DISCUSSION

Our previous work demonstrated that CyPB specifically bound to the surface of human lymphoblastic T-cells [16]. At 37 °C, the protein was internalized and subsequently degraded within the cell. Here we present new results concerning the properties of the CyPB-CsA complex towards human blood T-lymphocytes. As expected, the CyPB-CsA complex bound to blood T-cells in a specific manner, to the same extent as free CyPB. The complex and its binding site were internalized, but, in contrast to CyPB, the drug accumulated within the cell and the putative receptor was recycled to the cell surface. Moreover, the complexed drug retained its immunosuppressive properties, suggesting that CsA and its receptor dissociate and follow separate metabolic pathways within the cell. Finally, the analysis of drug concentration required for 50% inhibition of T-cell proliferation showed that the CyPB-complexed CsA was more efficient than free CsA, suggesting CyPB and its surface binding site enhanced the drug activity.

Published data concerning CyPB are often divergent and poorly documented in contrast to the well-studied abundant cyclophilin A (CyPA). For instance, the subcellular localization of CyPB is the subject of debate. Arber et al. [18] suggest that the protein co-localizes with calreticulin in some intracellular vesicles which they called calciosomes. They have demonstrated that the protein is retained in these vesicles through its specific C-terminal extension. However, we have reported the characterization of CyPB in human biological fluids, using purification and ELISA procedures [19,20]. Price et al. [22] suggest that CyPB may act as a chaperone and escort the neosynthesized proteins along the sorting pathway. They also found this protein to be localized on the cell surface and released into the medium. Recently, the protein was even shown to be abundantly secreted together with HSP47 in escorting procollagen into the secretory pathway [23]. The possible role of CyPB in CsA-mediated immunosuppression has also been investigated. 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 (nuclear factor of activated T-cell) 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 intervene in this process. An indirect role has been proposed, in relation with the relative concentrations of both CyPA and CyPB, in cells. Thus, Foxwell et al. [24] have suggested that the CsA-resistance of the fibroblastic cell line MRC5 may be due to the higher level of CyPB than CyPA. This hypothesis is in agreement with our selective ELISA measurements, which showed that lymphocytes exhibit very low concentrations of CyPB versus CyPA [20]. Other recent studies suggest a direct role of CyPB in CsA-mediated immunosuppression [25]. In fact, by using the two-hybrid system in yeast, Bram and Crabtree [25] have cloned and expressed a putative receptor for CyPB. This reticulum membrane protein, called CAML for 'calcium-signal modulating cyclophilin ligand', may be involved in the modulation of the  $Ca^{2+}$  transduction pathway. By inhibiting CyPB function, CsA might block the activity of CAML and consequently lead to a 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.

According to the data of the literature and our own experiments, CyPB surface binding sites would be related to at least three functions. We showed that CyPB-binding sites were endocytosed in the presence of the ligand and recycled in T-cells as indicated by their re-expression on the cell surface. As Price et al. [22] suggested, CyPB could act as a chaperone and the binding sites might be involved in the return of CyPB to reticulum vesicles. This hypothesis is in agreement with the recent data of Baker et al. [26], who demonstrated that the cyclophilin homologue NinaA functions as a chaperone and recycles back and forth within the secretory pathway. The internalization of the immunosuppressive complex might be coupled to receptor recycling, leading to a long-term action of CsA through the continual accumulation of the drug within T-cells. This might explain the increase in CsA activity we obtained when T-lymphocytes were exposed to the CyPB-complexed drug. Furthermore, the inter-individual variations of lymphocyte sensitivity were shown *in vitro* to be related to the concentrations of CsA [13]. CyPB, by targeting the drug to T-cells, might promote its incorporation and consequently abolish the phenomenon of cellular resistance. We recently demonstrated that CyPB largely increased the drug susceptibility of T-cells from several healthy subjects. These data confirm the hypothesis that extracellular CyPB may be related to the variations in drug sensitivity (F. Allain, A. Denys and G. Spik, unpublished work). A second function might be as a scavenger receptor for released CyPB since the protein was found here to be partially degraded within T-cells. Besides targeting the drug to lymphocytes, the CyPB binding sites might be associated with the toxicity of CsA therapy. They may occur on liver and kidney cell surfaces, leading to a damaging accumulation of the drug in these tissues. The third function of CyPB-binding sites might be related to the chemotactic activity of cyclophilins [27,28]. The formation of the CyPB-CsA complex would lead to blocking of a chemokine-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 that the drug depletes both activated and non-activated T-cells from the epidermis and dermis of psoriatic patients [29].

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

This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche no. 111; Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires; Director: Professor A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille and by grants from the European Economic Community (Biomed Program Contract BMH1-CT93-1748). 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, to P. Michaux, J. P. Dumon and M. Binchet for their assistance in the production of recombinant CyPB and to Dr. B. Foxwell and Dr. R. Pierce for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Haendler, B., Hofer-Warbinek, R. and Hofer, E. (1987) *EMBO J.* **6**, 947-950
- 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
- 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
- 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
- Kieffer, L. J., Seng, T. W., Li, W., Osterman, D. G., Handschumacher, R. E. and Bayney, R. M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12303-12310
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F. X. (1989) *Nature (London)* **337**, 476-478
- Takahashi, N., Hayano, T. and Suzuki, M. (1989) *Nature (London)* **337**, 473-475
- Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S. L. (1991) *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) *Biochemistry* **31**, 3896-3901
- Schreiber, S. L. (1992) *Cell* **70**, 365-368
- Sander, B., Brigati, C. and Miller, E. (1986) *Scand. J. Immunol.* **23**, 435-440
- Povlsen, J. V., Rasmussen, A., Madsen, M. and Lamm, L. U. (1990) *Scand. J. Immunol.* **32**, 45-51
- Masy, E., Labalette-Houache, M. and Dessaint, J. P. (1994) *Thérapie* **50**, 271-277
- Legrue, S. J., Friedman, A. W. and Kahen, B. D. (1983) *Transplant. Proc.* **15**, 2259-2264
- Cacalano, N. A., Chen, B. X., Cleveland, W. L. and Erlanger, B. F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4353-4357
- Allain, F., Denys, A. and Spik, G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16537-16540
- Hasel, K. W., Glass, J. R., Godbout, M. and Sutcliffe, J. G. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3484-3491
- Arber, S., Krause, K. H. and Caroni, P. (1992) *J. Cell Biol.* **116**, 113-125
- 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
- Allain, F., Boutillon, C., Mariller, C. and Spik, G. (1995) *J. Immunol. Methods* **178**, 113-120
- Julius, M. H., Simpson, E. and Herzenberg, L. A. (1973) *Eur. J. Immunol.* **3**, 645-649
- Price, E. R., Jin, M., Lim, D., Pali, S., Walsh, C. T. and McKeon, F. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3931-3935
- Smith, T., Ferreira, L. R., Hebert, C., Norris, K. and Sauk, J. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18323-18328
- Foxwell, B. M. J., Woerly, G., Husi, H., Mackie, A., Quesniaux, V. F. J., Hiestand, P. C., Wenger, R. M. and Rytfel, B. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 115-121
- Bram, R. J. and Crabtree, G. R. (1994) *Nature (London)* **371**, 355-358
- Baker, E. K., Colley, N. J. and Zuker, C. S. (1994) *EMBO J.* **13**, 4886-4895
- Sherry, B., Yarett, N., Strupp, A. and Cerami, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3511-3515
- Xu, Q., Leiva, M. C., Fischkoff, S. A., Handschumacher, R. E. and Lyttle, C. R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11968-11971
- Gupta, A. K., Baadsgaard, O., Ellis, C. N., Voorhees, J. J. and Cooper, K. D. (1989) *Arch. Dermatol. Res.* **281**, 219-226

## Involvement of the N-terminal part of cyclophilin B in the interaction with specific Jurkat T-cell binding sites

Christophe MARILLER\*, Bernard HAENDLER†, Fabrice ALLAIN\*, Agnès DENYS\* and Geneviève SPIK\*‡

\*Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique no. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, and †Research Laboratories of Schering AG, D-13342 Berlin, Germany

Cyclophilin B (CyPB) is secreted in biological fluids such as blood or milk and binds to a specific receptor present on the human lymphoblastic cell line Jurkat and on human peripheral blood lymphocytes. This study was intended to specify the areas of CyPB that are involved in the interaction with the receptor. A synthetic peptide corresponding to the first 24 N-terminal amino acid residues of CyPB was shown to specifically recognize the receptor. Moreover, modification of Arg<sup>18</sup> of CyPB by *p*-hydroxyphenylglyoxal led to a dramatic loss of affinity for the

receptor. However, when this residue was replaced by an alanine residue using site-directed mutagenesis, no modification of the binding properties was found, suggesting that Arg<sup>18</sup> is not directly involved but is sufficiently close to the interaction site to interfere with the binding when modified. Competitive binding experiments using a chimaeric protein made up of the 24 N-terminal amino acid residues of CyPB fused to the cyclophilin A core sequence confirmed the involvement of this region of CyPB in receptor binding.

### INTRODUCTION

Cyclophilins were first identified as the high-affinity binding proteins for the immunosuppressive drug cyclosporin A (CsA). CsA is a cyclic undecapeptide which was isolated over 20 years ago based on its ability to inhibit a mixed lymphocyte reaction [1]. Its clinical introduction greatly improved the outcome of solid organ and bone-marrow transplantation and, despite toxic side-effects, it remains a widely used immunosuppressive agent [2]. Cyclophilins are members of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase family, which includes also the FK506-binding proteins (FKBPs) [3] and the parvulins [4]. The FKBPs are able to bind the macrolide FK506, which is also used to prevent graft rejection but is structurally unrelated to CsA [5]. All these proteins catalyse the prolyl bond isomerization rate of synthetic peptides and the refolding of a few denatured proteins [3,6–8]. CsA inhibits cyclophilin prolyl isomerase activity [8], while FK506 inhibits FKBP prolyl isomerase activity [3].

Several cyclophilin isoforms with distinct subcellular localizations have been described in various prokaryotic and eukaryotic organisms. The first form characterized is cyclophilin A (CyPA), an abundant cytosolic protein which is considered to be the main target of CsA *in vivo* [9]. Indeed, the complex formed by the immunosuppressive drug and CyPA binds and modulates the activity of calcineurin [10], a critical intermediate in the signal transduction pathway recruited upon T-cell activation [11]. Cyclophilin B (CyPB) [12–14] and cyclophilin C (CyPC) [15] are related to CyPA but contain an N-terminal signal sequence thought to mediate translocation into the endoplasmic reticulum. Mitochondrial cyclophilin (CyPD) is the fourth member of the human cyclophilin family [16,17].

CyPB has been reported as being retained in specialized portions of the endoplasmic reticulum [18] but also as a protein which follows the secretory pathway until its secretion [19]. Its

purification from human milk has provided the evidence that CyPB is secreted into this medium [14]. Specific antibodies against peptides corresponding to the most divergent parts between CyPA and CyPB were used to show that CyPB, but not CyPA, is also present in human blood [20]. The binding capacity of CyPB to cells of the immune system was furthermore investigated and indeed surface binding sites characterized on both Jurkat T-cells and human peripheral blood T-lymphocytes. A dissociation constant ( $K_d$ ) of 12 nM was calculated and the number of binding sites estimated to be 35000/cell [21]. The CyPB–CsA complex binds to the T-lymphocytes with a similar  $K_d$  value and to approximately the same number of sites. At 37 °C, both the CyPB–CsA complex and free CyPB are internalized after binding. However, while CyPB is subsequently degraded in acidic compartments, CsA is accumulated within the cell. Thus, over a defined range of CyPB concentrations, the CyPB–CsA complex may target the drug to lymphocytes and increase the cellular concentration of CsA (see the accompanying paper [21a]). The presence of these surface binding sites is consistent with the hypothesis that CyPB is secreted into biological fluids such as milk or blood [14,20] and then interacts with specific receptors on target cells.

In an attempt to specify the areas of CyPB that interact with the surface binding sites of Jurkat cells, several competitive binding assays have been carried out. By comparing the amino acid sequence of CyPA, which does not interact with the Jurkat T-cell surface binding sites [21], and CyPB, it appears that the N- and C-terminal parts of CyPB are specific to this protein and may therefore contain the interaction site. We have therefore investigated the possible involvement of the N- and C-terminal extremities of CyPB in the binding to the Jurkat receptor by competitive experiments using synthetic peptides corresponding to these regions. CyPB mutants modified at specific locations, either chemically or by site-directed mutagenesis, and a CyPB<sub>7</sub>

Abbreviations used: AMCA-HPDP, *N*-[6-(7-amino-4-methylcoumarin)-3-acetamidohexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide; CyPA, CyPB and CyPC cyclophilins A, B and C; CsA, cyclosporin A, DPBS, Dulbecco's PBS; FKBP, FK506-binding protein; IL-8, interleukin 8.

‡ To whom correspondence should be addressed.

CyPA chimaera were furthermore used to gain information on the sites involved in the recognition of the specific receptor.

## EXPERIMENTAL

### Materials

CyPA, CyPC and the PCGF-72 plasmid coding for human CyPB were generous gifts from Sandoz (Basel, Switzerland). Synthetic peptides were kindly provided by Professor A. Tartar, Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Unité de Recherche Associée no. 1319 du Centre National de la Recherche Scientifique, Lille, France.

*N*-[6-(7-Amino-4-methylcoumarin)-3-acetamidohexyl]-3'-(2'-pyridylthio)propionamide (AMCA-HPDP) and *p*-hydroxyphenylglyoxal were purchased from Pierce (Rockford, U.S.A.).

### Construction of CyPB mutants

The CyPB/A chimaera was constructed in two steps. First, the region coding for the N-terminal part of mature CyPB up to Arg<sup>26</sup> was amplified by PCR while adding a flanking *Nco*I site, including the ATG initiator codon, at the 5' side, and flanking *Mlu*I and *Hind*III restriction sites at the 3' end. The *Mlu*I site was selected because it was compatible with the desired final amino acid sequence and not present in the original cyclophilin coding sequences. The *Hind*III site was used, together with *Nco*I, for subcloning into the pKK233-2 vector (Pharmacia, Uppsala, Sweden), after purification on a low-melting-point agarose (FMC) gel. Secondly, the CyPA coding region from Gly<sup>18</sup> to the stop codon was amplified by PCR while introducing flanking *Mlu*I and *Hind*III restriction sites. After gel purification and digestion with the appropriate enzymes this fragment was subcloned downstream of the CyPB coding portion in pKK233-2. The resulting plasmid codes for a protein composed of the CyPB-specific N-terminal region (up to Val<sup>24</sup>) fused to amino acids Gly<sup>18</sup> to end residue Glu of CyPA.

For the CyPB<sup>L171:R18A</sup> construct, the region coding for the N-terminal region of CyPB up to Gly<sup>25</sup> was amplified with PCR using the same 5' primer as above and a 3' primer designed so as to introduce the desired mutations while adding flanking *Aat*II and *Hind*III restriction sites. The *Aat*II site was selected because it was compatible with the desired final amino acid sequence and not present in the original cyclophilin coding sequence. This fragment was subcloned between the *Nco*I and *Hind*III sites of pKK233-2. The region coding for the remainder of CyPB was amplified by PCR while introducing flanking *Aat*II and *Hind*III sites. It was subcloned downstream of the above-mentioned fragment in pKK233-2 to generate a plasmid coding for a mutant form of CyPB where Leu<sup>17</sup> and Arg<sup>18</sup> have been changed to Ile and Ala, respectively.

All the constructs were verified by complete DNA sequencing on the cyclophilin-coding part and the flanking regions, and then used for transformation of competent *Escherichia coli*. A single colony was picked in each case for the expression studies. Cultures (1.5–3 l) of transformed *E. coli* were grown at 37 °C to an absorption value at 550 nm of 2. Induction was with 1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside for 4 h before harvesting.

### Preparation of recombinant wild-type and mutant CyPB

Purifications of recombinant wild-type CyPB and CyPB<sup>L171:R18A</sup> were performed using the procedure described in [14]. Purification of the CyPB/A chimaera was performed using the same procedure but the ion-exchange chromatography step on a Mono S column was performed at pH 6.0 instead of pH 6.5 due to the lower pI of the protein.

### Peptide synthesis

Peptides were synthesized using the conventional solid-phase 'Boc-benzyl strategy' [22] on 'PAM' resins [23] in an automated Applied BioSystem 470A peptide synthesizer, using an *N,N*-dicyclohexylcarbodi-imide/hydroxybenzotriazole-based coupling procedure. After fluorohydric acid cleavage from the resin in the presence of scavengers, crude deprotected peptides were purified by trifluoroacetic acid/diethyl ether precipitation followed by gel permeation.

### Derivatization of recombinant CyPB with *p*-hydroxyphenylglyoxal and AMCA-HPDP

#### Labelling of CyPB with AMCA-HPDP

A sample (0.536 mg) of AMCA-HPDP was dissolved in 1 ml of DMSO (1.55 mM final concentration). CyPB was diluted in PBS/EDTA (1 mM) to a final concentration of 0.5 mg/ml. CyPB was conjugated with AMCA-HPDP at a molar ratio of reagent to CyPB of 10:1. Incubation was performed at room temperature for 90 min. The reaction of AMCA-HPDP with the sulphhydryl group of CyPB was followed with spectrophotometry since the reaction leaving group, pyridine-2-thione, has a characteristic absorption at 343 nm. Free AMCA-HPDP was removed by gel filtration on a Sephadex G-25 PD10 column (Pharmacia). The ratio of AMCA-HPDP to CyPB was estimated by measuring the absorbance values at 280 nm and 345 nm according to the instructions of the manufacturer.

#### Modification of arginine residues with *p*-hydroxyphenylglyoxal

An aliquot (0.5 mg) of CyPB (or CyPB<sup>L171:R18A</sup> or \*D<sup>1</sup>EKKKG-PKVTVKVYFDLRIGDEDV<sup>24</sup> peptide) was reacted with 0.5 mg of *p*-hydroxyphenylglyoxal in 0.5 ml of 0.1 M sodium borate buffer, pH 9.0. The reaction mixture was incubated for 1 h at 25 °C in the dark. The excess of *p*-hydroxyphenylglyoxal was eliminated by gel filtration on a Sephadex G-25 PD10 column (Pharmacia) for CyPB and on a Sephadex G-10 column (1.5 cm × 10 cm) for the D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV<sup>24</sup> peptide. The content of modified arginine residues was estimated based on the molar absorption coefficient for the product. Modified arginine residues exhibit a maximum absorbance at 335 nm with a molar absorption coefficient of  $1.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  at pH 9.0 [24].

### Cells

The human lymphoblastic T-cell line Jurkat was routinely cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Inc.) containing 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 5 µg/ml gentamicin (pH 7.3), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. The culture was diluted every 2 days in order to maintain a cell concentration ranging from  $0.5 \times 10^6$  to  $1 \times 10^6$  cells/ml.

### Competition binding assays

<sup>125</sup>I-CyPB was obtained by incubating 100 µg of protein with 0.3 mCi of carrier-free Na<sup>125</sup>I (ICN Biochemicals, Costa Mesa, U.S.A.) in the presence of 100 µg of Iodo-Gen (Pierce, Rockford, U.S.A.) for 15 min at room temperature. Free iodine was removed by gel filtration on a Sephadex G-25 PD10 column. The specific radioactivity was approx.  $(2-3) \times 10^6$  c.p.m./µg.

The cells were washed twice and diluted in Dulbecco's PBS (DPBS)–0.5% BSA to a final concentration of  $4 \times 10^6$  cells/ml. The specificity of CyPB binding was studied by incubating

Jurkat T-cells ( $2 \times 10^6$  cells/sample) with 25 nM  $^{125}\text{I}$ -CyPB and a molar excess of competitors for 1 h at 4 °C. After incubation, the cells were centrifuged (400 *g*, 5 min) and washed three times with 3 ml of cold DPBS. Cell-associated radioactivity was measured using a model 1282 Compugamma LKB-Wallac counter.

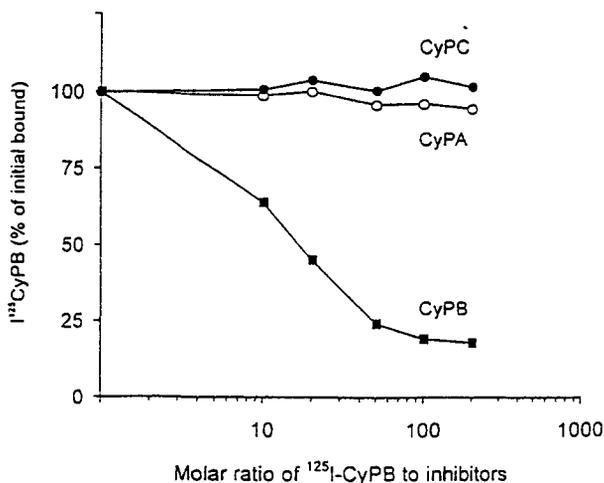
## RESULTS

### Competitive binding assays with cyclophilin isoforms

The specificity of CyPB binding to Jurkat T-cells was examined by competitive binding experiments in the presence of two other cyclophilins, CyPA and CyPC. Unlabelled CyPA, CyPB or CyPC were tested for their ability to compete with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for binding to the receptor. To this end, cells were incubated with recombinant  $^{125}\text{I}$ -CyPB in the presence of increasing concentrations of unlabelled cyclophilins (Figure 1). As expected,  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding was inhibited by 80% in the presence of a 500 molar excess of unlabelled CyPB. Conversely, neither CyPA nor CyPC had a competitive effect on the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells, showing that these two proteins have no affinity for the CyPB receptor present on these cells.

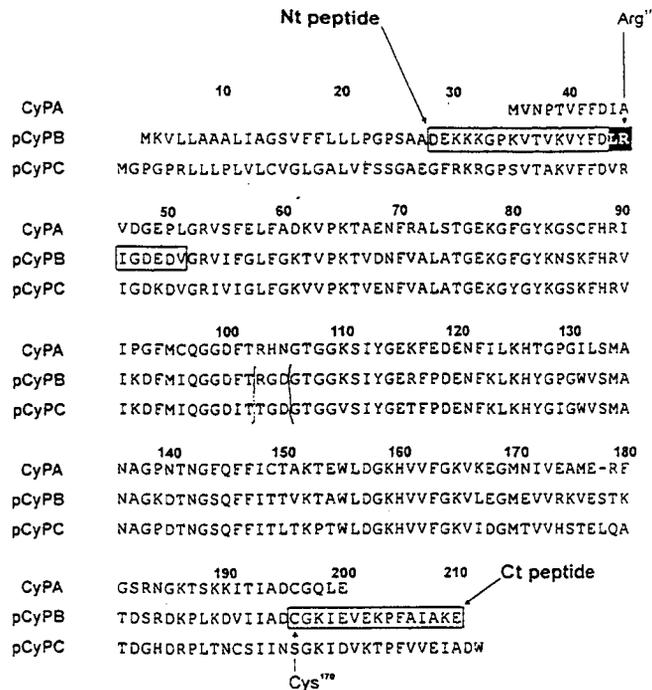
### Competitive binding assays with the synthetic peptides corresponding to CyPB extremities

The interactions of the synthetic peptides corresponding to the first 24 N-terminal amino acid residues ( $\text{D}^1\text{EKKKGPKVT-VKVYFDLRIGDEDV}^{24}$ ) and to the last 15 C-terminal amino acid residues ( $\text{C}^{170}\text{GKIEVEKPFIAIKE}^{184}$ ) of CyPB (Figure 2) were characterized by competitive binding experiments using Jurkat T-cells. The cells were incubated with recombinant  $^{125}\text{I}$ -CyPB in the presence of various concentrations of unlabelled peptides (Figure 3). The binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat cells was specifically inhibited by addition of the N-terminal peptide but not by the C-terminal peptide derived from CyPB. Increased concentrations of the N-terminal peptide (from 10 to 500 molar excess) inhibited the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB up to 38%. The



**Figure 1** Competitive binding assays of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells with other cyclophilins

Jurkat T-cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at 4 °C together with increasing concentrations of CyPA (○), CyPB (■) or CyPC (●). The amount of bound  $^{125}\text{I}$ -CyPB, as a percentage of  $^{125}\text{I}$ -CyPB bound in the absence of competitor, is plotted against the molar ratio of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to the competitors. Data are expressed as mean values from three separate representative experiments.



**Figure 2** Amino acid sequence alignment of CyPB with CyPA and CyPC

The  $\text{D}^1\text{EKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV}^{24}$  and  $\text{C}^{170}\text{GKIEVEKPFIAIKE}^{184}$  peptides are boxed and respectively termed N-terminal (Nt) peptide and C-terminal (Ct) peptide. The  $\text{L}^{171}\text{R}^{18\text{A}}$  sequence in CyPB which is replaced by  $\text{I}^{17\text{A}}\text{R}^{18}$  in CyPA is typed in white on black. Arg<sup>18</sup> and Cys<sup>170</sup>, which are modified by *p*-hydroxyphenylglyoxal and AMCA-HPDP respectively, are indicated by arrows

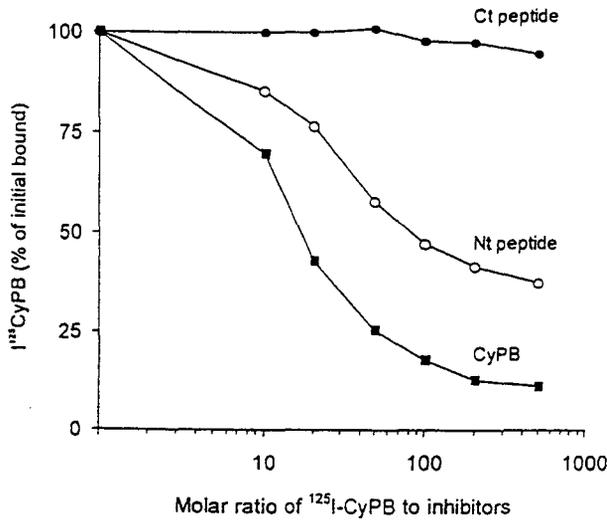
concentration of unlabelled N-terminal peptide required for half maximal inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) of  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding was 2.2  $\mu\text{M}$ .

### Competitive binding assays with modified CyPB and modified N-terminal peptide

CyPB was modified either by AMCA-HPDP for targeting the single cysteine residue, or by *p*-hydroxyphenylglyoxal for the arginine residues. The modified proteins were then used as competitors in competitive experiments carried out as described above.

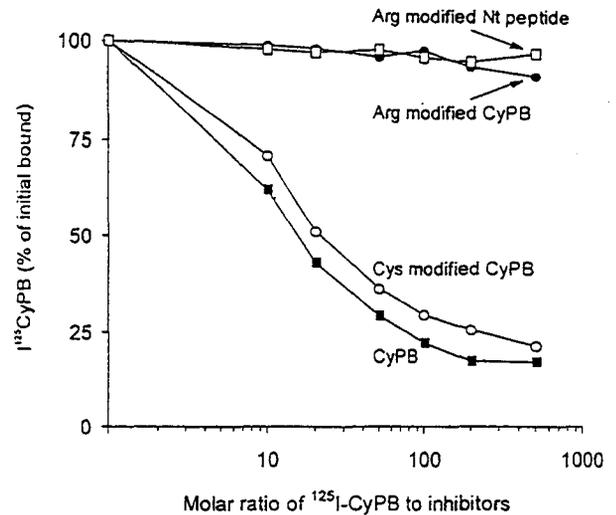
#### Modification of cyclophilins with *p*-hydroxyphenylglyoxal

To investigate the possible involvement of arginine residues in the binding of CyPB to Jurkat T-cells, CyPB was treated with *p*-hydroxyphenylglyoxal under mild conditions. This compound modifies proteins by reacting highly selectively with the guanidyl group of the arginine residues to form a stable complex [24]. The *p*-hydroxyphenylglyoxal reaction with arginine residues in proteins is accompanied by a marked spectral change. Figure 4 shows the UV absorption spectra of *p*-hydroxyphenylglyoxal treated CyPB and  $\text{CyPB}^{\text{L171:R18A}}$ . The CyPB spectrum (Figure 4 curve a) has a maximum absorption at 335 nm as expected for a *p*-hydroxyphenylglyoxal-modified protein. A molar absorption coefficient of  $1.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at pH 9.0 was used to determine the amount of modified arginine residues [24]. The extent of reaction of arginine residues with *p*-hydroxyphenylglyoxal calculated using this value and the absorption at 335 nm, was 1.15 residues per molecule. In contrast, the modified  $\text{CyPB}^{\text{L171:R18A}}$  spectrum (Figure 4, curve b), which lacks the



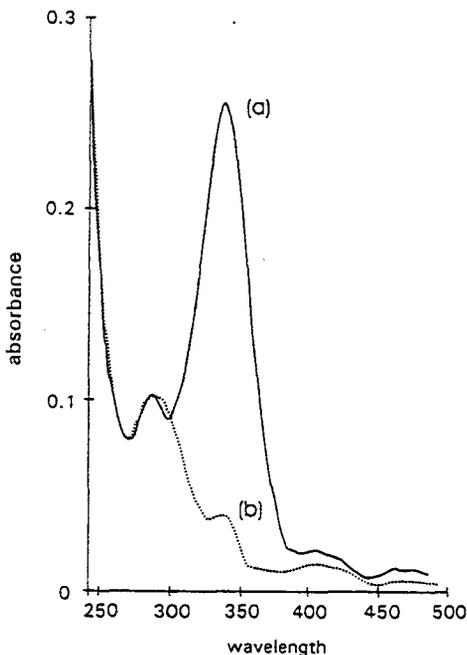
**Figure 3** Competitive binding assays of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells with synthetic peptides corresponding to CyPB extremities

Jurkat T-cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at  $4^\circ\text{C}$  together with increasing concentrations of CyPB (■), D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sup>24</sup> peptide (○) (Nt peptide) and C<sup>170</sup>GKIEVEKPFAlAKE<sup>184</sup> (●) (Ct peptide). The amount of  $^{125}\text{I}$ -CyPB, as a percentage of  $^{125}\text{I}$ -CyPB bound in the absence of competitor, is plotted against the molar ratio of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to the competitors. Data are expressed as mean values from three separate representative experiments.



**Figure 5** Competitive binding assays of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells with modified CyPB or N-terminal (Nt) peptide

Jurkat T-cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at  $4^\circ\text{C}$  together with increasing concentrations of CyPB (■), AMCA-HPDP-labelled CyPB (○) (Cys-modified CyPB), *p*-hydroxyphenylglyoxal-modified CyPB (●) (Arg-modified CyPB) and *p*-hydroxyphenylglyoxal-modified D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sup>24</sup> peptide (□) (Arg-modified Nt peptide). The amount of  $^{125}\text{I}$ -CyPB, as a percentage of  $^{125}\text{I}$ -CyPB bound in the absence of competitor, is plotted against the molar ratio of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to the unlabelled cyclophilins. Data are expressed as mean values from three separate representative experiments.



**Figure 4** UV absorption spectra of *p*-hydroxyphenylglyoxal-treated cyclophilins

Curve (a): CyPB treated with *p*-hydroxyphenylglyoxal at pH 9.0 for 1 h at  $25^\circ\text{C}$ . Curve (b): CyPB<sup>L171;R18A</sup> treated with *p*-hydroxyphenylglyoxal under the same conditions. The spectra were recorded at pH 9.0 and at room temperature.

Arg<sup>18</sup>, showed only a weak absorption at 335 nm, corresponding to 0.2 modified arginine residue per molecule. These values confirm that only a limited derivatization has taken place under

the conditions used since a total of seven and six arginine residues are present in CyPB and CyPB<sup>L171;R18A</sup> respectively.

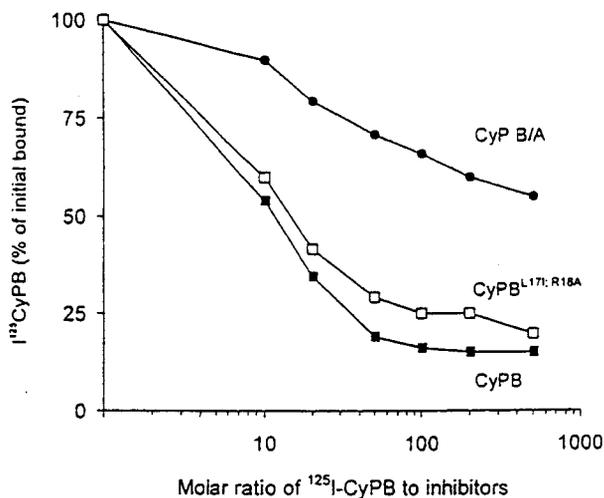
Competitive binding assays with modified CyPB, CyPB<sup>L171;R18A</sup> or the N-terminal peptide

The effect of the modification of CyPB with *p*-hydroxyphenylglyoxal on the association to the Jurkat T-cells is shown in Figure 5. The data demonstrate that the modification of one arginine residue of CyPB is accompanied by a loss of the binding to the Jurkat T-cells. A confirmation was obtained by modifying the only arginine residue of the D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sup>24</sup> peptide. The modified peptide also failed to compete with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for binding to its receptor (Figure 5).

The efficiency of the CyPB labelling by AMCA-HPDP was controlled by the measurement of absorbances at 280 nm and 345 nm. A fluorochrome/protein ratio of 0.82 was obtained, consistent with the fact that CyPB has only one cysteine residue, localized at position 170. As shown in Figure 5, derivatization of CyPB with AMCA-HPDP did not significantly interfere with its binding to Jurkat T-cells. Less than 20% of deviation of the IC<sub>50</sub> value was observed using AMCA-HPDP-labelled CyPB as a competitor, even in 500 molar excess.

Competitive binding assays with CyPB mutants

In order to further confirm the importance of the N-terminus of CyPB in the interaction with the receptor, two mutant forms were engineered and tested. In one mutant the N-terminal region specific to CyPA was replaced by the N-terminal CyPB specific region to give a CyPB/A chimera. In the second mutant, the L<sup>17</sup>R<sup>18</sup> residues of CyPB were exchanged for the IA residues located at equivalent positions in the N-terminal region of CyPA, to give the CyPB<sup>L171;R18A</sup> mutant. Competitive binding experiments were carried out to test the affinity of these CyPB



**Figure 6** Competitive binding assays of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells with CyPB mutants

Jurkat T-cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at 4 °C together with increasing concentrations of CyPB (■), CyPB<sup>L171;R18A</sup> (□) and CyPB/A (●). The amount of labelled CyPB, as a percentage of  $^{125}\text{I}$ -CyPB bound in the absence of  $^{125}\text{I}$ -CyPB, is plotted against the molar ratio of competitor to the unlabelled cyclophilins. Data are expressed as mean values from three separate representative experiments.

mutants for the Jurkat T-cell receptor (Figure 6). The CyPB/A chimera was able to inhibit the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB but only to a certain extent. The  $\text{IC}_{50}$  of CyPB/A chimera was estimated to be 21  $\mu\text{M}$  and corresponds to a 70-fold lower affinity for the receptor than CyPB. In contrast, the CyPB<sup>L171;R18A</sup> mutant inhibited  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding as well as CyPB did. The  $\text{IC}_{50}$  values of CyPB and CyPB<sup>L171;R18A</sup> binding to the specific receptor differ by less than 20%.

## DISCUSSION

Although CyPA and CyPC are closely related to CyPB, they do not bind to the Jurkat T-cell receptor [21]. This is accountable for CyPA which is exclusively cytosolic and exhibits several marked structural divergences from CyPB. It is more surprising for CyPC since it shares more than 70% sequence identity with CyPB. It has so far not been demonstrated that CyPC is secreted despite the presence of a signal sequence which directs it to the secretory pathway [9,15]. The only known ligand for CyPC, the CyPC-associated protein (CyCAP), is also a protein which follows the secretory pathway [25]. Our results demonstrate the fine specificity of the interaction between CyPB and its receptor on Jurkat T-cells.

Major sequence differences between CyPA and CyPB are located in the N- and C-terminal regions, which were therefore obvious choices for use in competitive binding experiments. Antibodies raised against the corresponding peptides D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sup>24</sup> and C<sup>170</sup>GKIEVEKPFIAIAKE<sup>184</sup> do not recognize CyPA [20], testifying to the specificity of these peptides. While the C<sup>170</sup>GKIEVEKPFIAIAKE<sup>184</sup> peptide had no inhibitory effect on the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells, the D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sup>24</sup> peptide inhibited the binding down to 38% of control levels. The incomplete inhibition observed for this peptide (only a 5-fold increase of  $\text{IC}_{50}$ ) may be explained by secondary

structure differences and/or by the fact that all the residues involved in the interaction with the receptor are not included in this peptide.

The comparison of the X-ray structures of CyPA and CyPB shows that the proteins share the same overall conformation except for two loops, one of them located between the residues 19 to 24 of CyPB [26]. The area covered by the D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sup>24</sup> peptide therefore encompasses one of the two main structural differences between CyPA and CyPB, consistent with the fact that, unlike CyPB, CyPA does not bind to Jurkat T-cells [21].

Chemical modification of arginine residues has been proved valuable in understanding structure–function relationships in proteins [27]. In our study, we modified the arginine residues of CyPB with *p*-hydroxyphenylglyoxal. This compound specifically neutralizes the positive charge of arginine by complexation with the guanidyl group but leaves the other amino acids unchanged. Our results clearly demonstrate that the derivatization of one arginine residue in CyPB abolishes its capacity to inhibit the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells. The arginine residue modified by *p*-hydroxyphenylglyoxal in CyPB might be Arg<sup>18</sup>, since only one arginine residue is modified in the protein under mild conditions and modified D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sup>24</sup> peptide is also unable to inhibit the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells. Another piece of evidence that Arg<sup>18</sup> is the modified arginine residue is provided by the treated CyPB<sup>L171;R18A</sup>, which shows only 0.2 modified arginine residue. We surmise that this residue is particularly exposed at the surface of the molecule and easily modified by chemical agents. There is no corresponding arginine residue in CyPA. Taking all this together, it is likely that Arg<sup>18</sup> is at least indirectly involved in the interaction with the receptor. It is close enough to the CyPB-interacting site to prevent binding by steric hindrance when modified. Actually, it has been shown that two molecules of *p*-hydroxyphenylglyoxal react with one arginine residue to form a high size complex [24].

Labelling a protein in the vicinity of the receptor-binding site by a fluorophore is a good tool with which to inhibit protein–protein interaction by masking the interaction site. CyPB has a single cysteine residue located at position 170 just before the C-terminal extension. Furthermore, the N- and C-terminus ends of CyPB are aggregated together and point away from the molecular bulk to form a  $\beta$ -strand [25]. To hide this part of the protein, AMCA-HPDP was used because of its high specificity for sulphhydryl groups and the presence of a six-carbon arm creating a high steric hindrance. But, despite a fluorophore/protein ratio of 0.82, the labelling of CyPB by AMCA-HPDP had only a minor effect on the binding to the Jurkat T-cell receptor, indicating that the receptor binding site is not in the area close to the modified cysteine residue. This cysteine is also found in the C<sup>170</sup>GKIEVEKPFIAIAKE<sup>184</sup> peptide, and the absence of inhibitory effect of this peptide is in agreement with this finding.

Two CyPB mutants were designed to complete the results described above. In the CyPB/A chimera, the N-terminus of CyPB up to Val<sup>24</sup> was exchanged for the corresponding region of CyPA. The chimaeric protein binds to the Jurkat receptor, however, with a 70-fold lower affinity than CyPB. There are at least two possible explanations for this. First, the lower affinity might be due to a different conformation of D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sup>24</sup>, when placed in CyPA instead of CyPB. This is supported by the fact that the  $\text{IC}_{50}$  of the free D<sup>1</sup>EKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sup>24</sup> peptide is 10-fold higher than the one measured for the CyPB/A chimera. Secondly, it is possible that another part of CyPB is involved in the interaction with the receptor. This is observed for instance

with interleukin-8 (IL-8) binding to both its A and B type receptors. While the E<sup>4</sup>LR<sup>6</sup> sequence is necessary for the binding, the Tyr<sup>13</sup> and Lys<sup>15</sup> residues are required for a high-affinity binding [28]. There are some similarities between the cyclophilins and IL-8. In fact, like the cyclophilins, IL-8 is able to specifically bind to CsA. IL-8 was described as a dimeric molecule with a three-dimensional structure resembling that of the cyclophilins [29]. Moreover, the E<sup>4</sup>LR<sup>6</sup> consensus sequence of IL-8 is quite similar to the D<sup>15</sup>LR<sup>18</sup> sequence of CyPB, suggesting that these residues may be important for the CyPB interaction with the receptor. In contrast to the results obtained when using *p*-hydroxyphenylglyoxal, a CyPB mutant where the L<sup>17</sup>R<sup>18</sup> sequence was modified to the corresponding I<sup>11</sup>A<sup>12</sup> sequence of CyPA binds to the Jurkat receptor as well as CyPB does, suggesting that neither Leu<sup>17</sup> nor Arg<sup>18</sup> directly interact with the receptor. Consequently, the best explanation for the loss of competitive binding of Arg-derivatized CyPB is probably that the modification forms a complex sufficiently large and close to the binding site to prevent the interaction with the receptor.

In conclusion, our results demonstrate that the first 24 amino acid residues of CyPB are involved in the binding to Jurkat T-cells. This region contains a single arginine residue, preventing the interaction with the receptor when derivatized but not when mutated to Ala. The use of molecular modelling to visualize the effects of the chemical modifications of arginine and cysteine residues will be another step towards a better characterization of the CyPB-binding site. Site-directed mutagenesis will allow a more precise characterization of the amino acid residues directly implicated in the interaction with the receptor. We also confirm the specificity of the Jurkat T-cell binding sites for CyPB, as opposed to CyPA, in keeping with the fact that CyPB is secreted in biological fluids such as blood and milk and that CyPA is exclusively cytosolic. CyPC does not bind to Jurkat T-cells either despite the presence in its N-terminal region of a stretch highly similar to the 24 N-terminal amino acids of CyPB. Interestingly, the amino acid corresponding to Arg<sup>18</sup> of CyPB is conserved in CyPC. A fine analysis of the differences between the different cyclophilins should provide further clues as to the residues involved in receptor binding by CyPB.

This investigation was supported in part by Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche no. 111 (Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires; Director: Professor A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille, and by the European Economic Community (Biomed Program Contract BMH1-CT93-1748). We thank Christophe Boutillon for the

synthesis of the peptides used in this work, Eve Damiens for her help in manipulations and Vincent Mikol for providing atomic co-ordinates of CyPB.

## REFERENCES

- 1 Sigal, N. H. and Dumont, F. J. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 519–560
- 2 Borel, J. F. (1989) *Pharmacol. Rev.* **41**, 259–371
- 3 Siekerka, J. J., Hung, S. H. Y., Poe, M. Lin, C. S. and Sigal, N. H. (1989) *Nature (London)* **341**, 755–757
- 4 Rahfeld, J.-U., Schierhorn, A., Mann, K. and Fischer, G. (1994) *FEBS Lett.* **343**, 65–69
- 5 Schreiber, S. L. (1991) *Science* **251**, 283–287
- 6 Fischer, G. and Bang, H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **828**, 39–42
- 7 Schonbrunner, E. R., Mayer, S., Tropeschug, M., Fischer, G., Takahashi, N. and Schmidt, F. X. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3630–3635
- 8 Fischer, G., Wiltmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F. X. (1989) *Nature (London)* **337**, 476–478
- 9 Bram, R. J., Hung, D. T., Martin, P. K., Schreiber, S. L. and Crabtree G. R. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4760–4769
- 10 Liu, J., Farmer, J. D. J., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S. (1991) *Cell* **66**, 807–815
- 11 Clipstone, N. A. and Crabtree G. R. (1992) *Nature (London)* **357**, 695–697
- 12 Hasel, K. W., Glass, J. R., Godbout, M. and Sutcliffe, J. G. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3484–3491
- 13 Price, E. R., Zydowsky, L. D., Jin, M. J., Baker, C. H., McKeon, F. D. and Walsh, C. T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1903–1907
- 14 Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Sledman, K., Kocher, H. P., Keller, R., Hiestand, P. C. and Movva, N. R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10735–10738
- 15 Friedman, J. and Weissman, I. (1991) *Cell* **66**, 799–806
- 16 Connern, C. P. and Halestrap, A. P. (1992) *Biochem. J.* **284**, 381–385
- 17 Kay, J. E. (1992) *Biochem. J.* **288**, 1074–1075
- 18 Arber, S., Krause, K. H. and Caroni, P. (1992) *J. Cell Biol.* **116**, 113–125
- 19 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
- 20 Allain, F., Boutillon, C., Mariller, C. and Spik, G. (1995) *J. Immunol. Methods* **178**, 113–120
- 21 Allain, F., Denys, A. and Spik, G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16537–16540
- 21a Allain, F., Denys, A. and Spik, G. (1996) *Biochem. J.* **317**, 565–570
- 22 Merrifield, R. B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2219–2225
- 23 Mitchell, A. R., Erickson, B. W., Ryabtsev, M. N., Hodges, R. S. and Merrifield, R. B. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7358–7362
- 24 Yamasaki, R. B., Vega, A. and Feeney, R. E. (1980) *Anal. Biochem.* **109**, 32–40
- 25 Friedman, J., Trahey, J. and Weissman, I. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6815–6819
- 26 Mikol, V., Kallen, J. and Walkinshaw, M. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5183–5186
- 27 Ziere, G. J., van Dijk, M., Bijsterbosch, M. K. and van Berkel, T. J. C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11229–11235
- 28 Schraufstatter, I. U., Min, M., Oades, Z. G., Barrit, D. S. and Cochrane C. G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10428–10431
- 29 Bang, H., Brune, K., Nager C. and Feige U. (1993) *Experientia* **49**, 533–538

## Distribution of cyclophilin B-binding sites in the subsets of human peripheral blood lymphocytes

A. DENYS,\* F. ALLAIN,\* B. FOXWELL† & G. SPIK\* \*Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du Centre National de Recherche Scientifique n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France, and †Kennedy Institute of Rheumatology, Hammersmith, London, UK

### SUMMARY

Cyclophilin B (CyPB) is a cyclosporin A (CsA)-binding protein, mainly associated with the secretory pathway and released in biological fluids. We have recently demonstrated that both free CyPB and CyPB–CsA complex specifically bind to peripheral blood T lymphocytes and are internalized. These results suggest that CyPB might promote the targeting of the drug into sensitive cells. Peripheral blood lymphocytes are subdivided in several populations according to their biological functions and sensitivity to CsA. We have investigated the binding of CyPB to these different subsets using a CyPB derivatized by fluorescein through its single cysteine which retains its binding properties. We have confirmed that only T cells were involved in the interaction with CyPB. The ligand binding was found to be heterogeneously distributed on the different T-cell subsets and surface-bound CyPB was mainly associated with the CD4-positive cells. No significant difference was noted between the CD45RA and CD45RO subsets, demonstrating that CyPB-binding sites were equally distributed between native and memory T cells. CD3 stimulation of T lymphocytes led to a decrease in the CyPB-binding capacity, that may be explained by a down-regulation of the CyPB-receptor expression upon T-cell activation. Finally, we demonstrated that CyPB-receptor-positive cells, isolated on CyPB sulphhydryl-coupled affinity matrices, are more sensitive to CyPB-complexed CsA than mixed peripheral blood lymphocytes, suggesting that CyPB potentiates CsA activity through the binding of the complex. Taken together, our results demonstrate that CyPB-binding sites are mainly associated with resting cells of the helper T lymphocyte, and that CyPB might modulate the distribution of CsA through the drug targeting to sensitive cells.

### INTRODUCTION

Cyclophilins [CyP(s)] are ubiquitous, highly conserved proteins, known to be the main binding proteins for the immunosuppressant cyclosporin A (CsA), a drug widely used to prevent graft rejection.<sup>1</sup> They exhibit peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase (PPIase) activity and are able to accelerate the *cis-trans* isomerization of artificial substrates and the refolding of denatured proteins.<sup>2,3</sup> Nevertheless, the relevance of this activity for the intracellular functions of these proteins remains

yet unknown. Although the PPIase activity of CyP(s) is inhibited by CsA, the inhibition of enzymatic activity is not directly related to CsA-mediated immunosuppression. The drug causes immunosuppression by forming a complex with cyclophilin A (CyPA) that inhibits calcineurin activity, a Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent serine-threonine phosphatase.<sup>4</sup> The formation of such a ternary complex is thought to be a crucial step in blocking effectively the early T-cell activation cascade and constitutes the basis of the immunosuppressive activity of CsA.<sup>5,6</sup>

Received 25 November 1996; revised 6 April 1997; accepted 15 April 1997.

Abbreviations: CsA, cyclosporin A; CyPA, cyclophilin A; CyPB, cyclophilin B; CyP(s), cyclophilins; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; FITC, fluorescein isothiocyanate;  $\Delta$ FMV, variation of fluorescence mean value; IL-2, interleukin-2; PBL, peripheral blood lymphocytes; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PE, phycoerythrin; rhCyPB, recombinant human CyPB.

Several CyP isoforms have been found localized into the different subcellular compartments. The most abundant one, CyPA, is a soluble, cytosolic protein which represents the major intracellular target for CsA.<sup>7</sup> Cyclophilin B (CyPB) was found to be located in endoplasmic reticulum<sup>8,9</sup> and released into biological fluids, such as human milk and plasma.<sup>10,11</sup> Other isoforms which differ in their subcellular and/or tissue distribution have also been described.<sup>12</sup> Moreover, some authors have identified secreted CyP(s) in biological fluids<sup>13</sup> and culture medium supernatants,<sup>14,15</sup> which possess biological functions, such as growth factor<sup>16</sup> or chemotactic activities.<sup>13,17</sup>

Correspondence: Dr G. Spik, Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS no. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59 655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

These facts suggest the existence of cell membrane receptors, but the corresponding proteins have not yet been identified.

Recently, we have reported the characterization of specific cell surface binding sites for CyPB on human T cells.<sup>17</sup> Moreover, we have shown that the CyPB–CsA complex was bound to T lymphocytes and internalized to the same extent that free CyPB, releasing the drug intracellularly in an active form.<sup>18</sup> Extracellular CyPB might therefore target CsA to T lymphocytes and consequently increase the cellular sensitivity to the drug. Peripheral blood lymphocytes (PBL) are represented by several subsets which exhibit marked differences in sensitivity to CsA.<sup>19</sup> This variation in drug sensitivity may be explained by differences in the expression of CyPB-binding sites among lymphocyte subpopulations, leading to variations in CyPB–CsA complex incorporation and to a heterogeneous response to CsA. To confirm this hypothesis, we used a double-staining method by flow cytometry to determine the phenotype of CyPB-receptor-expressing cells. In this way, T cells were identified by the expression of the CD3 molecule, while B and natural killer (NK) cells were identified by CD19 and CD56 markers, respectively. Human T cells were then subdivided into helper/inducer and cytotoxic/suppressor subsets exploiting the different patterns of CD4 and CD8 molecules. Finally, the expression of other markers, such as CD28, HLA-DR or CD45 isoforms, was investigated to provide more information on T-cell subsets.<sup>20</sup>

In the current study, we have analysed the distribution of CyPB-binding sites by flow cytometry using a fluorescein-labelled ligand, derivatized through the single cysteine residue of CyPB. We confirmed that only T cells were able to interact with CyPB. The ligand-binding sites displayed a heterogeneous distribution among the different T-cell subpopulations. Moreover, we showed that T-cell activation leads to a decrease in the ligand binding and that CyPB potentiates the activity of CsA to inhibit CD3-induced proliferation of CyPB-receptor-positive T cells. Taken together, our results demonstrate that CyPB-binding sites are variously expressed on the membrane of CsA-sensitive T cells and support the hypothesis that expression of CyPB-receptor might be related to variations of the drug susceptibility.

## MATERIALS AND METHODS

### *Preparation of lymphocytes*

Human citrated venous blood was obtained from a local Blood Transfusion Centre (Lille, France). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation on Lymphoprep separation medium (Nycomed, Oslo, Norway). After washing with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO), PBMC were resuspended either in DPBS containing 0.5% of bovine serum albumin (DPBS–BSA) for direct analysis, or in RPMI-1640 medium (Life Technologies Inc., Paisley, UK) containing 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, gentamycin (5 µg/ml), pH 7.3, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, for *in vitro* culture. Lymphocyte stimulation was performed by incubating cells for 72 hr at 37° in a 96-well plate, in the presence of a monoclonal anti-CD3 antibody (Immunotech, Marseille, France) at 50 ng/ml.

### *Preparation of labelled CyPB*

Recombinant human CyPB (rhCyPB) was purified as previously described.<sup>10</sup> Fluorescein-labelling of rhCyPB was performed using either fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma, St Louis, MO), an amine-reactive probe, or fluorescein-5-maleimide (Pierce Chemical Co., Rockford, IL), a sulphhydryl-reactive probe. Fluorescein-N-rhCyPB was prepared by incubating 250 µg of rhCyPB (25 µM) with freshly dissolved FITC (10 mM in dimethyl-sulphoxide), at concentrations ranging from 50 to 200 µM, in 0.1 M sodium carbonate, pH 9.2, for 2 hr at room temperature. Fluorescein-S-rhCyPB was obtained according to the procedure provided by the manufacturer. Briefly, 250 µg of rhCyPB were incubated in the presence of a 25-fold molar excess of freshly dissolved fluorescein-5-maleimide (25 mM in dimethyl-formamide) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, for 2 hr at 22°. The mixtures were then applied to a Sephadex G-25 PD-10 column, in order to remove the excess of reagent. All experiments were performed in the dark. The ratio of fluorescein to protein was estimated by measuring the absorbance at 495 and 280 nm according to Jobbagy & Kiraly.<sup>21</sup> Radio-iodinated rhCyPB ([<sup>125</sup>I]rhCyPB) was prepared as previously described.<sup>17</sup>

### *Competitive binding experiments*

PBMC were collected as described above and resuspended in cold DBPS–BSA (0.5%) at a final concentration of 4 × 10<sup>6</sup> cells/ml. Cells were then incubated in the presence of 25 nM of [<sup>125</sup>I]rhCyPB and various molar excesses of either unlabelled or fluorescein-derivatized ligands. After 1 hr incubation at 4°, cells were washed and the remaining cell-associated radioactivity was measured using a model 1282 Compugamma LKB-Wallac counter.

### *Binding of fluorescein-S-rhCyPB to resting and activated lymphocytes*

Cells were washed in cold DPBS and resuspended in DPBS–BSA to obtain a final concentration of 2 × 10<sup>5</sup> cells/sample. Fluorescein-S-rhCyPB was added to a final concentration of 100 nM for 1 hr at 4°. Non-specific binding was determined in parallel experiments in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled rhCyPB. After incubation at 4°, cells were centrifuged (400 g, 5 min), extensively washed and resuspended in DPBS for analysis.

### *Cell-surface marker analysis*

A two-step fluorescent staining method was developed for the detection of CyPB-receptor on lymphocyte membrane. As described above, cells were incubated with 100 nM fluorescein-S-rhCyPB for 1 hr at 4°. Cells expressing CD3, CD4, CD8, CD45RA and CD45RO were detected indirectly by incubating cells with mouse anti-human lymphocyte marker antibodies (Immunotech, Marseille, France) followed by phycoerythrin (PE)-labelled anti-mouse IgG (Sigma). CD28-, CD56- and HLA-DR-expressing cells were detected directly by using specific PE-conjugated antibodies (Dako, Trappes, France). All incubations were performed for 1 hr at 4° in staining buffer and cells were washed twice between each step.

### *Flow cytometry analysis*

Data were monitored on a Becton Dickinson fluorescence-activated cell sorter (FACS)Scan flow cytometer

equipped with an argon ion laser at 488 nm (Becton Dickinson, Mountain View, CA). 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 10 000 fluorescent particles of the gated population were analysed. The data collected with logarithmic amplification were analysed by Becton Dickinson computer.

#### Isolation of CyPB-receptor-positive and -negative lymphocytes

Since CD3-induced proliferation experiments require large amounts of cells bearing CyPB-receptor, we developed a method based on the isolation of CyPB-receptor-expressing cells with an affinity matrix. Recombinant human CyPB was conjugated to a SulfoLink Coupling Gel (Pierce Chemical Co.) through its single cysteine residue, according to the procedure provided by the manufacturer. Briefly, rhCyPB (1 mg/ml) was incubated in the presence of 2 ml of gel matrix in a Tris 50 mM, EDTA 5 mM buffer, pH 8.3, for 1 hr at room temperature. After washing off the excess of unconjugated rhCyPB, the matrix was treated with the same buffer containing 10 mM of free cysteine, for 30 min, in order to block unreacted groups. The matrix was extensively washed in DPBS and resuspended in RPMI medium. All steps were performed under aseptic conditions with sterilized solutions. The amount of rhCyPB immobilized on the affinity matrix was estimated for 2 mg/ml of gel, after measurement of unimmobilized CyPB absorbance at 280 nm.

After depletion of monocytes, by adhesion for 1 hr at 37°, PBL were mixed with the gel matrix and incubated for 1 hr at room temperature under gentle rolling. Unbound cells, which correspond to CyPB-receptor-negative lymphocytes, were collected in the washing supernatants of three cycles of decanting/resuspension with DPBS. CyPB-receptor-positive cells were removed from the matrix by mild-acid wash with DPBS-citrate pH 4, and rapidly washed in DPBS pH 7.4 containing 0.5% of BSA. Finally, both populations were concentrated to  $1 \times 10^6$  cells/ml in complete RPMI medium and analysed for cell viability and purity before use.

#### Analysis of CsA immunosuppressive activity

Cells were then stimulated for 72 hr in a 96-well plate coated with monoclonal anti-CD3 antibodies (Immunotech, Marseille, France), at 10 µg/ml. Cell proliferation was investigated by measuring the incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine (18 kBq/well) for 5 hr before harvesting. Results are expressed as an index of proliferation; the value of 100% represents the proliferation of PBL obtained in the absence of drug. The half-inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was determined by incubating cells in the presence of increasing concentrations of free CsA and CyPB-complexed CsA from 6 to 500 ng/ml. Analysis between the index of proliferation and CsA doses allowed us to estimate IC<sub>50</sub> from the adjusted dose-response curve.

## RESULTS

### Competitive binding experiments with fluorescein-labelled CyPB(s)

To study whether the derivatization of CyPB maintained the binding properties of the ligand to the receptor, competitive binding experiments were performed between [<sup>125</sup>I]rhCyPB and either fluorescein-N-rhCyPB, fluorescein-S-rhCyPB, or unlab-

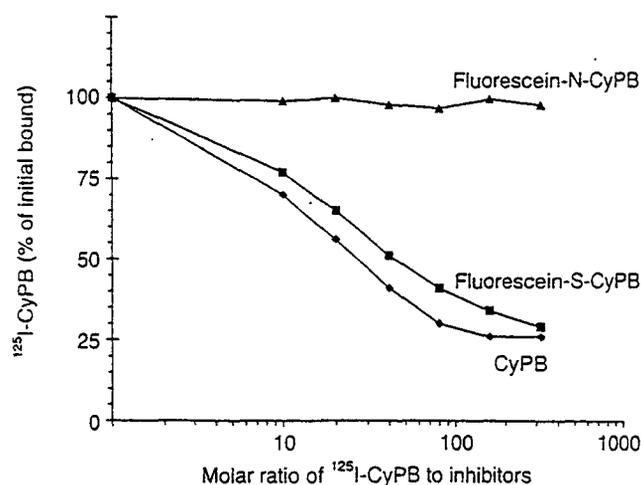
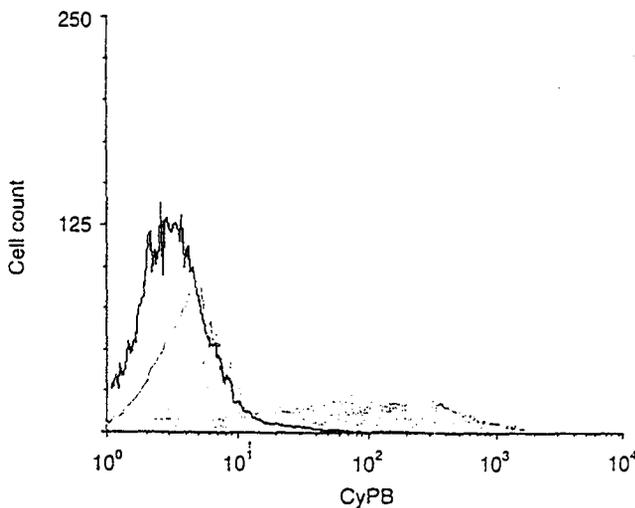


Figure 1. Competitive experiments for [<sup>125</sup>I]CyPB binding to PBL. Competitive binding experiments were performed by incubating T cells in the presence of 25 nM of [<sup>125</sup>I]rhCyPB and various concentrations of either unlabelled rhCyPB (◆), fluorescein-N- (▲) or fluorescein-S-rhCyPB (■). After 1 hr of incubation at 4°, cells were washed and the remaining cell surface radioactivity was counted and expressed as percentage in comparison with control. Data represent the mean values of triplicates for each ligand.

elled protein. T cells were incubated in the presence of 25 nM [<sup>125</sup>I]rhCyPB and various concentrations of derivatized ligands. As shown in Fig. 1, fluorescein-N-rhCyPB failed to compete with [<sup>125</sup>I]rhCyPB for binding to its receptor, suggesting that the derivatization of rhCyPB with FITC abolished its binding properties. Moreover, reducing the amine-reactive probe concentration did not give a ratio of bound fluorescein to the protein lower than 2.5. These results suggest that the domain of CyPB involved in the interactions with the surface binding sites is close to two or three highly reactive amine groups, corresponding most probably to the exposed lysine residues located in the N-terminal region. The efficiency of rhCyPB labelling by maleimide-5-fluorescein was controlled by the measurement of absorbances at 280 nm and 490 nm. A fluorochrome:protein ratio of 0.8 was obtained, consistent with the fact that CyPB has only one cysteine residue. Derivatization of CyPB by fluorescein-5-maleimide did not significantly interfere with its binding to T cells (Fig. 1). Binding of [<sup>125</sup>I]rhCyPB was inhibited by 50% in the presence of a 25 molar excess of unlabelled rhCyPB, while 50% inhibition was obtained with a 40 molar excess of fluorescein-S-rhCyPB. This difference of IC<sub>50</sub> values might be explained by some steric hindrance of the fluorescent group, leading to a slight loss of affinity of fluorescein-labelled rhCyPB. In spite of this modification, fluorescein-S-rhCyPB retains its binding properties. These results confirm that the sulphhydryl group is distant enough from the binding domain to allow its derivatization without abolishment of the binding properties of rhCyPB.

### Surface binding of fluorescent rhCyPB

The addition of rhCyPB to the lymphocyte suspension resulted in an asymmetrical flow profile of fluorescence, suggesting the existence of two cell populations for CyPB binding (Fig. 2).



**Figure 2.** Surface binding of CyPB to the whole population of PBL. Cells were incubated in the presence of 100 nM fluorescein-S-rhCyPB. After washing, surface binding of rhCyPB (filled peak) was analysed by flow cytometry, as described in the Materials and Methods. Non-specific binding (open peak) was determined in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled rhCyPB. Data are representative of separate experiments with similar results.

Incubation in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled rhCyPB led to the disappearance of the peak of higher fluorescence intensity. These results demonstrate that fluorescein-S-rhCyPB binding to PBL was specific and confirm that derivatized rhCyPB through its single cysteine residue is an efficient probe with which to analyse binding of CyPB. After washing off the excess unlabelled ligand, the incubation of cells together with a 10-fold molar excess of unlabelled rhCyPB led to a rapid removal of surface-bound ligand, demonstrating that fluorescein-S-rhCyPB binding is reversible (data not shown). Furthermore, superimposition of the first peak of the total binding with the flow profile of non-specific binding demonstrates, that this peak corresponded to a PBL population without detectable CyPB binding. On the other hand, the second peak of fluorescence displayed a broad repartition. These results suggest that the heterogeneity of CyPB binding to PBL may be related to a variable expression of the CyPB-receptor onto different cells. We then compared rhCyPB binding to PBL from several healthy donors ( $n=20$ ). Binding of rhCyPB was found to display important inter-individual variations. Actually, the lymphocyte population which showed significant interaction with the ligand varied individually from 20 to 60% of the whole PBL population.

#### Phenotype of CyPB-receptor-expressing cells

PBL were represented by several subpopulations which may be characterized by the expression of specific cell membrane markers. In this way, the heterogeneous CyPB binding to lymphocytes might be related to a variable expression of the receptor among these different subsets. To identify the phenotype of PBL which possesses CyPB-binding sites, cells were incubated in the presence of fluorescein-labelled rhCyPB and antibodies against membrane antigens related to specific populations. The distribution of surface-bound CyPB among the

different subpopulations of lymphocytes has been studied for 11 healthy donors and frequency of PBL populations expressing CyPB-binding sites are represented in Table 1.

CD3 is the most representative cell membrane antigen of the T-cell population (Fig. 3a). This marker was expressed in 50–70% of PBL, and all cells which bound rhCyPB were found to belong to this subpopulation (Fig. 3b). CD19, HLA-DR and CD56 are specific markers for B-cell, B- and activated T-cell and NK-cell subsets, respectively. No significant rhCyPB binding was observed to the PBL subsets which express these different antigens. These results are in agreement with our previous work which demonstrated that CyPB specifically bound to resting T cells.<sup>17</sup>

Analysis of CD3<sup>+</sup> cells which bound rhCyPB revealed that only  $60 \pm 20\%$  (mean  $\pm$  SD) displayed a specific interaction with the ligand, suggesting that only a fraction of T cells are expressing the CyPB-receptor. T lymphocytes are commonly divided into helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations, according to the expression of CD4 or CD8 markers. In our experiments, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes were represented in an approximately similar ratio, but CyPB-binding sites were differently distributed in both subsets (Figs 3c,d). According to the proportions of CD4- and CD8-expressing cells, the results mean that  $64 \pm 16\%$  of CD4 and  $43 \pm 15\%$  of CD8-positive cells bound CyPB. Moreover, we found that  $62 \pm 19\%$  of PBL which bound CyPB were located in the CD4<sup>+</sup> subset and  $37 \pm 16\%$  in the CD8<sup>+</sup> subset, demonstrating that CyPB-binding sites were only expressed on CD3<sup>+</sup> cells and effectively distributed between these CD4 and CD8 populations of T cells. We then examined the distribution of CyPB-binding sites on PBL expressing the CD28 antigen, as this marker is represented in a T-cell subpopulation and is more expressed in CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> cells.<sup>22</sup> Nevertheless, the level of CD28<sup>+</sup> cells which bound CyPB was intermediate in comparison with CD4 and CD8, suggesting

**Table 1.** Distribution of CyPB-binding sites in different PBL subsets. PBL were incubated in the presence of fluorescein-S-rhCyPB and monoclonal antibodies to lymphocyte subsets markers. Cell staining was analysed by flow cytometry, as described in the Materials and Methods. Frequency of positive cells among PBL is representative of cells which express either antigen marker (CD<sup>+</sup>) or both CyPB-receptor and antigen marker (CyPB<sup>+</sup>/CD<sup>+</sup>). Ratio corresponds to the frequency of CyPB-receptor-expressing cells among each subset. Data are expressed as mean values  $\pm$  SD from separate experiments conducted with 11 healthy donors

PBL (%) Lymphocyte subsets	Frequency of positive cells among		
	CD <sup>+</sup>	CyPB <sup>+</sup> /CD <sup>+</sup>	Ratio
PBL	100	40 $\pm$ 11	40 $\pm$ 11
CD3	60 $\pm$ 10	36 $\pm$ 10	60 $\pm$ 20
CD4	39 $\pm$ 8	25 $\pm$ 8	64 $\pm$ 16
CD8	30 $\pm$ 10	13 $\pm$ 5	43 $\pm$ 15
CD28	52 $\pm$ 11	26 $\pm$ 9	50 $\pm$ 20
CD45RA	67 $\pm$ 13	25 $\pm$ 7	37 $\pm$ 20
CD45RO	33 $\pm$ 8	16 $\pm$ 5	48 $\pm$ 13
CD19	15 $\pm$ 7	ND*	/
CD56	24 $\pm$ 15	ND	/
HLA-DR	16 $\pm$ 8	ND	/

\*ND, not detectable (corresponding to non-specific binding).

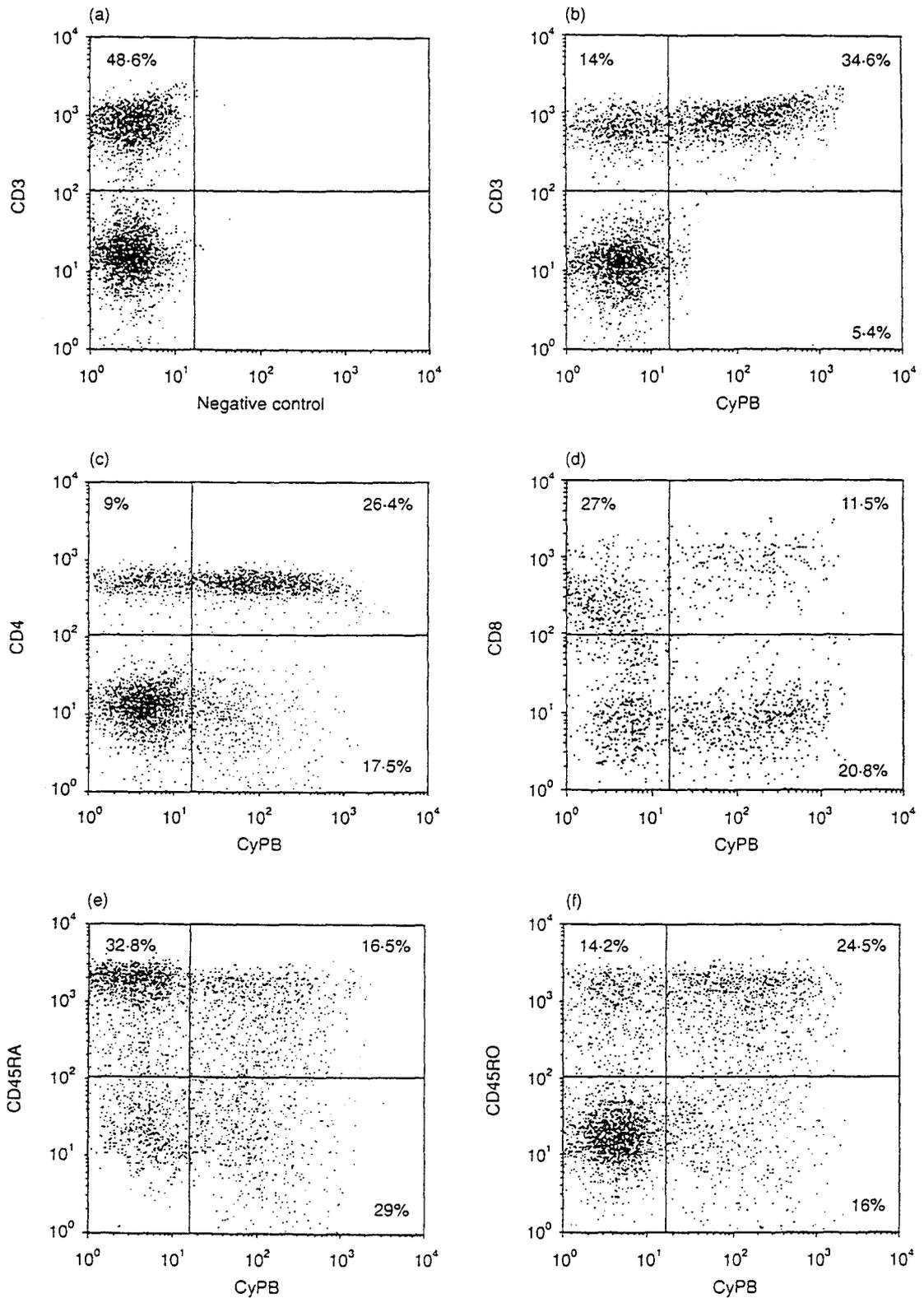


Figure 3. Detection of CyPB binding to different PBL subsets. Lymphocytes were analysed for expression of CyPB-receptor and either CD3 (b), CD4 (c), CD8 (d), CD45RA (e) or CD45RO (f), as described in the Materials and Methods. Negative control (a) was determined by incubating cells with a 100-fold molar excess of unlabelled rhCyPB. Quadrants were arranged such that all non-specifically rhCyPB-stained cells remained in the left quadrants. Numbers in the quadrants indicate percentages of positive cells. Fluorescence 1 = fluorescein signals (rhCyPB); fluorescence 2 = PE signals (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA, or anti-CD45RO). Dot plots were obtained from a single individual and are representative of separate experiments performed with lymphocytes from 11 donors.

that the expression of the CyPB-receptor is not restricted to this subpopulation.

PBL may also be classified into native and memory subpopulations, with regard to the presentation to antigen and their dependence on interleukin-2 (IL-2). Although no marker is selective enough to discriminate these phenotypes in humans, analysis of the leucocyte CD45 antigen is often used to study both subpopulations.<sup>23</sup> The CD45RA isoform is expressed in the majority of native T cells, while the truncated CD45RO isoform is mainly restricted to the memory T-cell subset. Nevertheless, surface-bound rhCyPB was found to be distributed between both populations (Figs 3e,f). The sum of CD45RA/CyPB-receptor-positive PBL ( $25 \pm 7\%$ ) and CD45RO/CyPB-receptor-positive PBL ( $16 \pm 5\%$ ) was consistent with the  $36 \pm 10\%$  of PBL expressing both CD3 marker and CyPB-receptor, suggesting that CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> cells which bound CyPB were effectively T lymphocytes. Nevertheless, surface-bound rhCyPB was distributed in similar ratios in both CD45RA and CD45RO populations. These results suggest that the CyPB-receptor expression is not related to the maturation step of peripheral blood T cells.

#### Comparison of CyPB binding between resting and activated T cells

Binding of rhCyPB to activated T lymphocytes was then investigated and compared to resting T cells from the same individuals ( $n=17$  healthy donors). PBL were stimulated for 72 hr in the presence of an anti-CD3 monoclonal antibody to produce lymphocyte activation at a mean ratio of  $65 \pm 15\%$ . Flow cytometry analysis allowed the distinction of small resting PBL (R1) from large proliferating T cells (R2) according to the light scatter. As shown in Fig. 4, rhCyPB binding to both resting and activated T cells resulted in two peaks of fluorescence. Nevertheless, the shifts in the fluorescence corresponding to CyPB-receptor-expressing cells was less for activated T cells than for resting cells. We then quantified rhCyPB binding by calculating the variations of fluorescence mean values ( $\Delta FMV$ ) and found  $115 \pm 44\%$  and  $69 \pm 26\%$ , for resting versus activated T lymphocytes, respectively. The decrease in surface-bound rhCyPB was not due to the disappearance of receptor expressing cells, since they represented  $36 \pm 11\%$  and  $32 \pm 12\%$  of both the resting and activated PBL populations, respectively. In contrast,  $\Delta FMV$  of ligand binding to the restricted subpopulations of CyPB-receptor-expressing cells were  $384 \pm 25\%$  and  $154 \pm 13\%$ , respectively. These results demonstrate that the lower CyPB binding to the activated T-cell population was due to a decrease in the number of sites per cell rather than to the appearance of lymphocytes unable to interact with CyPB.

#### CsA-sensitivity of CyPB-receptor-positive and -negative lymphocytes

In order to study the role of CyPB in the CsA sensitivity of T cells, we attempted to isolate PBL into CyPB-receptor-positive and -negative subpopulations, using an affinity procedure. The purity of both populations was controlled by analysis of fluorescein-S-rhCyPB binding. In this way, more than 95% of cells which were retained to the affinity column, bound the fluorescent ligand effectively, demonstrating the

efficiency of the method. As expected, purified CyPB-receptor-positive cells represented  $30 \pm 10\%$  of the whole PBL population, and expressed the CD3 marker. The ratios of [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in CyPB-receptor-positive and -negative cells relative to that in PBL were 2 and 0.56, respectively. This demonstrated differences in CD3-induced proliferation which can be explained by the repartition of T cells in both isolated populations in comparison with that of mixed PBL. Indeed, the isolation of CyPB-receptor-positive cells led to the enrichment of CD3-expressing cells and to the consequent diminishment of T cells in the CyPB-receptor-negative cells.

We then investigated the influence of CyPB on the dose-response to CsA. As already described,<sup>18</sup> the concentration of rhCyPB-complexed CsA required for 50% inhibition of PBL proliferation ( $IC_{50}$ ) was lower than that of free CsA ( $15.3 \pm 8.1$  versus  $21.5 \pm 11.3$  ng/ml, respectively), confirming that CyPB enhances the incorporation of the drug. These experiments were then reproduced with isolated CyPB-receptor-positive and -negative cells. No marked difference was observed for free CsA, demonstrating that the drug inhibited cell proliferation to the same extent in both populations. In contrast, the  $IC_{50}$  of rhCyPB-complexed CsA were estimated to be  $7.6 \pm 4$  and  $30.5 \pm 16.2$  ng/ml for the CyPB-receptor-positive and -negative cells, respectively (Fig. 5). The  $IC_{50}$  of mixed PBL to complexed drug was intermediate to the  $IC_{50}$  of both isolated populations, this may be explained by the concentration of CsA-sensitive lymphocytes in the CyPB-receptor-positive cell population, and the consequent depletion of these sensitive cells in the CyPB-receptor-negative cell population. These results demonstrate that CyPB may enhance CsA activity through the binding of CyPB-CsA complex to its receptor and the consequent incorporation of the drug.

#### DISCUSSION

In our previous work,<sup>17,18</sup> we had investigated the interactions of rhCyPB with the T-cell membrane by using radio-iodinated ligand. Nevertheless, this method was not suitable for the study of the distribution of CyPB-binding sites and distinguish between the different lymphocyte subpopulations. Thus, the best approach to determine the specific binding of CyPB to PBL subsets was to develop a direct method to detect surface-bound CyPB by flow cytometry. The major problem was to prepare a fluorescein-labelled ligand retaining its binding properties. Indeed, the derivatization occurs in a reactive region of the protein that is often involved in the binding domain to the receptor. To avoid this problem, we tested two different fluorescein reactive probes, FITC and fluorescein-5-maleimide, which specifically reacts with amine and sulphhydryl groups, respectively. Thus, we showed that fluorescein-N-rhCyPB was unable to interact with the T-cell membrane. These results are consistent with the demonstration that the binding domain of CyPB is partially located in the N-terminal first 25 amino acids of the protein.<sup>24</sup> Since this region contains five lysine residues, it was conceivable to conclude that the derivatization of at least two of these residues induced a steric hindrance and abolished the binding properties of CyPB. By contrast, the C-terminal part containing the single cysteine residue, was shown not to be involved in the CyPB-binding domain. Indeed, the derivatization of the cysteine residue with

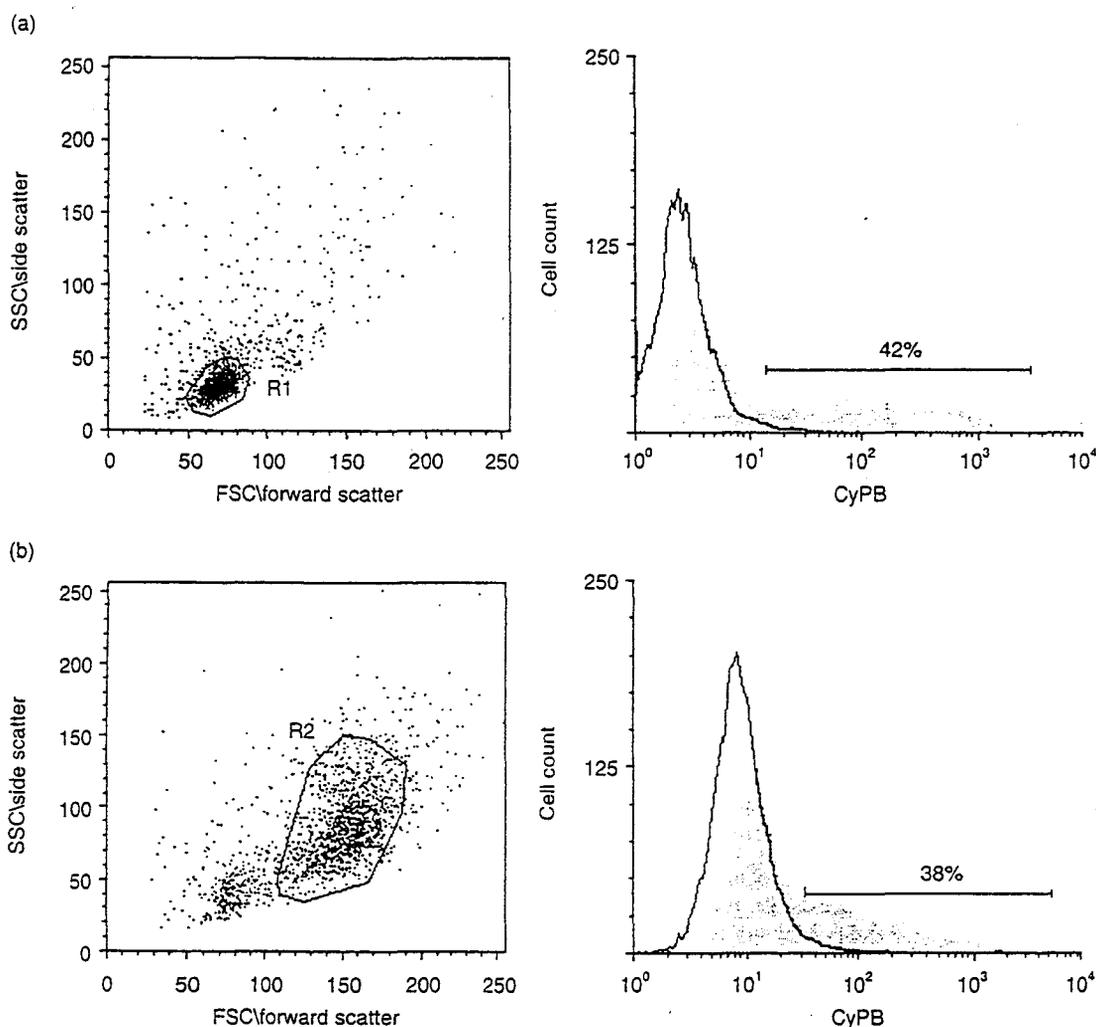


Figure 4. Detection of surface CyPB binding to resting (a) and activated (b) T cells. PBL were cultured for 3 days in the presence or absence of an anti-CD3 antibody and the binding of fluorescein-S-rhCyPB was performed as also described. Dot-plots show gating of small resting (R1) and large activated (R2) cells, according to light scatter. Flow profiles show surface binding of CyPB to respective cells. Open and filled flow profiles correspond to non-specific and total binding, respectively. Numbers indicate the percentage of CyPB-receptor-expressing cells. Data were obtained from single individuals and are representative of separate experiments with similar results conducted with 17 donors.

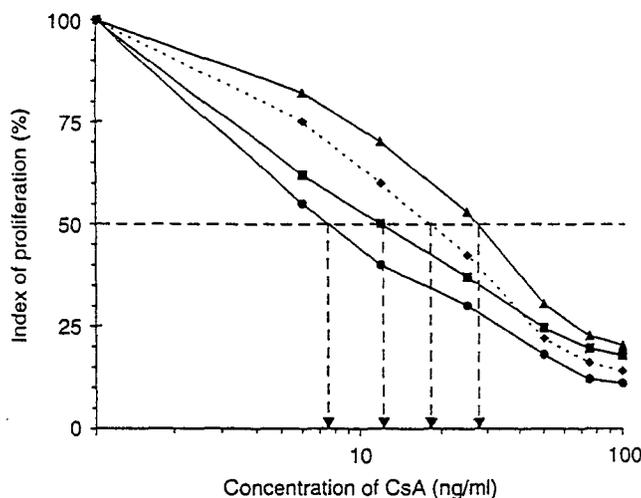
AMCA-HPDP (*N*-[6-(7-amino-4-methylcoumarin)-3-acetamidohexyl]-3'-(2'-pyridyldithio) propionamide) did not interfere with the binding properties of CyPB to the Jurkat T-cell receptor.<sup>24</sup> These data are consistent with the present results, demonstrating that the derivatization of this residue with the specific thiol-reactive probe, fluorescein-5-maleimide, proved to be the best method by which to prepare a fluorescein-labelled CyPB retaining its binding properties.

The binding of fluorescein-S-rhCyPB to PBL was found to be heterogeneous, suggesting that the binding sites display a variable expression on cell membrane. Double-step fluorescent staining experiments allowed us to demonstrate that surface CyPB-binding sites were associated with the T-cell subsets. The variable expression seems to be independent of the cell phenotype, because no notable difference in CyPB binding could be related to PBL subpopulations. Although CyPB binding was more pronounced in the CD4-expressing cells, it was not possible to correlate the expression of the receptor to

a well-characterized subpopulation of T lymphocytes. Moreover, no significant difference in CyPB binding was observed between native and memory T cells, with regard to the differential expression of CD45RA and CD45RO isoforms.<sup>23</sup> In contrast, the number of CyPB-receptors was significantly reduced on *in vitro* activated versus resting T cells, suggesting that activation induces a down-regulation of the CyPB-receptor expression. We had previously reported that lymphocyte activation did not affect the binding of radiolabelled rhCyPB.<sup>17</sup> As we had investigated [<sup>125</sup>I]rhCyPB binding to the whole PBL population, it was not possible to dissociate CyPB-receptor-expressing cells from those devoid of binding sites and the values we had calculated corresponded only to mean values. On the other hand, the flow cytometry method was more appropriate to distinguish these two populations and to analyse variations of CyPB binding.

In the same individual, the lymphocyte population displayed a heterogeneity with regard to maturation step and





**Figure 5.** Half-inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) for lymphocytes CD3-induced proliferation in the presence of CyPB-complexed CsA. Dose-response curves were determined by [ $^3H$ ]thymidine incorporation into CD3-stimulated mixed PBL exposed to increasing concentrations of either free CsA (◆), or CyPB-complexed drug (■) and in CD3-stimulated CyPB-receptor-positive (●) or -negative cells (▲) exposed to various concentrations of CyPB-complexed CsA. The half-inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were determined from the adjusted dose-response curves between index of proliferation and CsA concentrations. Data are mean values from triplicates and are representative of three separate experiments conducted with distinct donors.

functions of different subsets. The focal point of CsA immunosuppression is the inhibition of the activation of the helper/inducer class of T lymphocytes.<sup>19</sup> The activation of this T-cell subset plays a crucial role in the promotion and the control of immune response, particularly for the synthesis and the release of lymphokine mediators.<sup>25</sup> These factors, in particular IL-2, stimulate other immunocompetent cells, as the CD8/cytolytic lymphocytes, and promote an autocrine clonal expansion of activated CD4/helper cells. CsA suppresses the induction of cytolytic effector lymphocytes through the inhibition of IL-2 synthesis by CD4/helper lymphocytes,<sup>26</sup> whereas the drug has no effect on suppressor lymphocytes.<sup>27,28</sup> Moreover, memory T cells are less sensitive to CsA than native cells because their proliferation is no more dependent on IL-2.<sup>29</sup> Recently, we have shown that extracellular CyPB mediated CsA incorporation into human blood T lymphocytes through the specific binding of complexed drug to the cell surface, that led to an increase in the *in vitro* immunosuppressive activity of the drug.<sup>18</sup> The present data further demonstrated that CyPB-receptor-positive T cells are more sensitive to CyPB-complexed CsA than unfractionated PBL. Taken together, these results support the hypothesis that CyPB enhances the incorporation of the drug into T cells through the specific binding of the CyPB-CsA complex. As CyPB-receptor is mainly expressed on the membrane of CD4/helper T cells, it is conceivable to relate the variations of sensitivity to CsA to a specific targeting of CyPB-complexed CsA to the sensitive lymphocyte subpopulation. On the other hand, secreted CyP(s) have been reported to exhibit chemotactic activity.<sup>13,15</sup> Thus, CyPB-receptor might be involved in inflammatory mechanisms associated with graft rejection and autoimmune diseases. Released CyPB would induce the

migration of T lymphocytes, in particular helper T cells, to the inflammation site and thus participate in the early phase of sensitization. In contrast, the formation of the CyPB-CsA complex would lead to the block of this chemokine-like activity and the drug might consequently act as an anti-inflammatory agent by inhibiting the migration of T lymphocytes.

In summary, we have confirmed that CyPB-binding sites are mainly associated with the CsA-sensitive T-cell population. Our results suggest that CyPB and its receptor might be involved in the immunosuppressive and anti-inflammatory activities of the drug. Our aim is to further investigate the biological functions of extracellular CyPB in order to confirm the role of this protein in the selective action of CsA.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche no. 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 BMH1-CT93-1748). We are grateful to Dr D. Brevière for providing us with blood samples, to P. Michaux and M. Benaïssa for their assistance in the production of recombinant human CyPB, to Dr E. Masy for his assistance and helpful discussion.

#### REFERENCES

- BOREL J.F., BEURER C., GUBLER H.U. & STÄHELIN M. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents & Actions* 6, 468.
- FISCHER G., WITTMANN-LIEBOLD B., LANG K., KIEFHABER T. & SCHMID F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 476.
- TAKAHASHI N., HAYANO T. & SUZUKI M. (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337, 473.
- LIU J., FARMER J.D., LANE W.S., FRIEDMAN J., WEISSMAN I. & SCHREIBER S.L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807.
- LIU J., ALBERS M.W., WANDLESS T.J. *et al.* (1992) Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* 31, 3896.
- SCHREIBER S.L. & CRABTREE G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13, 136.
- HANDSCHUMACHER R.E., HARDING M.W., RICE J., DRUGGE R.J. & SPEICHER D.W. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544.
- HASEL K.W., GLASS J.R., GODBOUT M. & SUTCLIFFE J.G. (1991) An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin. *Mol Cell Biol* 11, 3483.
- ARBER S., KRAUSE K.H. & 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.
- SPIK G., HAENDLER B., DELMAS O. *et al.* (1991) A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J Biol Chem* 266, 10 735.
- ALLAIN F., BOUTILLON C., MARILLER C. & SPIK G. (1995) Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies. *J Immunol Methods* 178, 113.
- GALAT A. (1993) Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem* 216, 689.
- XU Q., LEIVA M.C., FISCHKOFF S.A., HANDSCHUMACHER R.E. & LYTTLE C.R. (1992) Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem* 267, 11 968.

14. DAVIS T.R., TABATABAI L., BRUNS K. HAMILTON R.T. & NILSENS-HAMILTON M. (1991) Basic fibroblast growth factor induces 3T3 fibroblasts to synthesize and secrete a cyclophilin-like protein and  $\beta_2$ -microglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1095, 145.
15. SHERRY B., YARLETT N., STRUPP A. & CERAMI A. (1992) Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3511.
16. CARONI P., ROTHENFLUH A., MCGLYNN E. & SCHNEIDER C. (1991) S-cyclophilin. New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway. *J Biol Chem* 266, 10 739.
17. ALLAIN F., DENYS A. & SPIK G. (1994) Characterization of surface-binding sites for cyclophilin B on a human tumor T-cell line. *J Biol Chem* 269, 16 537.
18. ALLAIN F., DENYS A. & SPIK G. (1996) Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through the specific binding of complexed drug to the cell surface. *Biochem J* 317, 565.
19. FOXWELL B.M.J. & RYFFEL B. (1989) The mechanisms of action of cyclosporine. *Immunol Allergy Clin North Am* 9, 79.
20. HANNET I., ERKELLER-YUKSEL F., LYDYARD P., DENEYS V. & DEBRUYERE M. (1992) Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today* 13, 215.
21. JOBBAGY A. & KIRALY K. (1966) Chemicals characterization fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. *Biochim Biophys Acta* 124, 166.
22. JUNE C.H., LEDBETTER J.A., LINSLEY P.S. & THOMPSON C.B. (1990) Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11, 211.
23. AKBAR A.N., SALMON M. & JANOSSY G. (1991) The synergy between naive and memory T-cells during activation. *Immunol Today* 12, 184.
24. MARILLER C., HAENDLER B., ALLAIN F., DENYS A. & SPIK G. (1996) Involvement of the N-terminal part of cyclophilin B in the interaction with specific Jurkat T-cell binding sites. *Biochem J* 317, 571.
25. GRANELLI-PIPERNO A., INABA K & STEINMAN R.M. (1984) Stimulation of lymphokine release from T lymphoblasts: Requirement for mRNA synthesis and inhibition by cyclosporin A. *J Exp Med* 160, 1792.
26. BUNJES D., HARDT C., RÖLLINGHOFF M. & 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.
27. HESS A.D. & TUTSCHKA P.J. (1980) Effect of cyclosporin on human lymphocyte responses *in vitro*. I. CsA allows for the expression of alloantigen-activated suppressor cells while preferentially inhibiting the induction of cytolytic effector lymphocytes in MLR. *J Immunol* 124, 2601.
28. BUCY R.P. (1988) The effects of immunosuppressive pharmacological agents on the induction of cytotoxic and suppressor T lymphocytes *in vitro*. *Immunopharmacology* 15, 65.
29. MOTTA I., COLLE J.H., SHIDANI B. & RUFFABACHI P. (1991) IL-2/IL-4-independent T helper cell generation during an *in vitro* antigenic stimulation of mouse spleen cells in the presence of cyclosporin A. *Eur J Immunol* 21, 551.