

N° d'ordre : 3350

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

Christophe VANPOUILLE

**ROLE DES PROTEOGLYCANNES A CHAINES
HEPARANES SULFATES DANS LA FIXATION ET
L'ACTIVITE PRO-ADHESIVE DE LA CYPB**

Soutenu le 03 octobre 2003 devant la commission d'examen :

Président : Pr. René CACAN (Université de Lille 1)
Rapporteurs : Dr. Dave FERNIG (Université de Liverpool)
Dr. Bernard HAENDLER (Schering AG, Berlin)
Examineurs : Dr. Fabrice ALLAIN (Université de Lille 1)
Dr. Maryse DELEHEDDE (Endotis Pharma, Lille)
Dr. Joël MAZURIER (Directeur de recherche CNRS, Lille)
Dr. Anne TSICOPOULOS (Directeur de recherche INSERM, Lille)

Ce travail a été réalisé sous la co-direction du Dr. J. Mazurier et du Dr. F. Allain dans le Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR n° 8576 du CNRS, Directeur : Dr Jean-Claude Michalski; Université des Sciences et Technologies de Lille).

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

Je remercie vivement les membres de ce jury :

Monsieur le professeur René CACAN,

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté la présidence du jury de cette thèse. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur le Docteur Dave FERNIG,

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli dans votre Laboratoire lors de ma venue à Liverpool et avoir contribué ainsi à une partie de mes résultats. J'ai beaucoup appris de vos compétences scientifiques et des discussions que nous avons eues sur la technologie des biocapteurs optiques. Votre venue en tant que rapporteur m'honore, soyez assuré de mes sincères remerciements et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Bernard HAENDLER,

Vous avez toujours suivi les travaux de la cyclophiline B avec beaucoup d'intérêt. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous portez à ce travail et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Joël MAZURIER,

Je te remercie de m'avoir accueilli au sein de ton équipe et d'avoir assuré avec Fabrice la co-direction de cette thèse après le départ en retraite du Professeur Geneviève Spik. Sois assuré de mes sincères remerciements et de ma plus profonde gratitude.

Monsieur le Docteur Fabrice ALLAIN,

Merci d'avoir assuré la co-direction et l'encadrement de ces travaux de thèse. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, ta patience et tes précieux conseils. J'ai vraiment apprécié de travailler à tes côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Ton dynamisme et ta passion pour la recherche sont deux voies à suivre pour les étudiants que tu encadres. Sois assuré par ces quelques mots de l'expression d'une très grande reconnaissance et de mon plus profond respect.

Madame le Docteur Maryse DELEHEDDE,

J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi lors de mon stage à Liverpool. J'ai su apprécier tes compétences, ta gentillesse et ton dynamisme. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec toi et à profiter de tes conseils. Merci de me faire l'honneur et la joie d'avoir acceptée de juger ce travail. Sois assurée de mes sincères remerciements et de ma plus profonde gratitude.

Madame le Docteur Anne TSICOPOULOS,

Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements et mon entière gratitude d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier tout particulièrement :

Madame le Professeur Geneviève SPIK,

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe et d'avoir assuré la co-direction de ma première année de thèse. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma plus vive reconnaissance et de mon profond respect.

Agnès,

Je te remercie sincèrement pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes nombreux conseils. Merci également pour l'aide précieuse que tu m'as apportée dans la réalisation des figures, les expériences de PCR et la relecture de cette thèse. Trouve ici tous mes remerciements et ma plus profonde gratitude.

Caroline, Denis, Catherine, David, Nadège, Séverine et Christelle,

Merci pour votre amitié, vos encouragements et votre gentillesse. Je n'oublierai pas les excellentes soirées que nous avons passées ensemble.

Mathieu,

Merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et tes précieux conseils en informatique.

Rachel,

Merci pour ta bonne humeur et ta participation dans les manips de biologie moléculaire. Je te souhaite autant de plaisir que j'en ai eu à travailler dans l'équipe.

Momo,

Je te remercie pour ta gentillesse et les moments partagés sur la route de V2.

Isabelle et Mathilde,

Merci pour votre bonne humeur et la très bonne ambiance qui régnait dans notre bureau.

Maryse,

Merci pour la relecture de cette thèse.

Toutes les personnes de l'étage,

Merci pour votre amitié et la bonne ambiance qui ont accompagné ce travail.

Et sans oublier mes parents ainsi que mon parrain et ma marraine. Merci pour votre soutien et vos encouragements durant toutes ces années d'étude.

Résumé

La cyclophiline B (CyPB) est une protéine qui catalyse l'isomérisation *cis/trans* de la liaison prolyle et qui se complexe à la cyclosporine A, un médicament immunosuppresseur. Bien que résidente des vésicules du réticulum endoplasmique et de la voie de sécrétion, la CyPB est également retrouvée dans le lait et le plasma. Deux types de site de fixation ont été mis en évidence à la surface des lymphocytes T, des récepteurs protéiques et des protéoglycannes à chaînes héparanes sulfates (HSPG). La CyPA, isoforme incapable de se fixer aux HSPG, et la CyPB ont en commun des activités chimioattractantes et la capacité à activer des voies de signalisation dépendantes du calcium. En revanche, seule la CyPB est capable d'augmenter l'adhésion cellulaire à la fibronectine *via* l'activation des intégrines $\alpha4\beta1$ et $\alpha4\beta7$. Cette activité pro-adhésive de la CyPB met en jeu un mécanisme dépendant des interactions avec les HSPG. En utilisant le modèle cellulaire HL-60, nous avons montré l'implication des syndécan-1 et -2 dans la modulation des réponses cellulaires induites par la fixation de la CyPB sur son récepteur. En utilisant l'héparine comme modèle, nous avons ensuite montré que la taille minimale du motif glycanique reconnu par la CyPB est un octasaccharide. Ce motif peut se loger dans une gouttière délimitée par les deux séquences $^3\text{KKK}^5$ et $^{14}\text{YFD}^{16}$ de la CyPB. L'interaction nécessite la présence de groupements N-, 2-, et 6-O-sulfates. Nos travaux sont également en faveur de l'implication d'un groupement aminé libre porté par une glucosamine. La fréquence de tels groupements est rare, ce qui explique l'étroite sélectivité de fixation de la CyPB. L'ensemble de nos résultats suggère que les syndécan-1 et -2 interviennent dans l'activité pro-adhésive de la CyPB en tant que molécules de co-activation. En outre, les chaînes héparanes de ces HSPG possèderaient des motifs structuraux particuliers responsables de la haute spécificité d'action de la CyPB.

ABREVIATIONS

Aa : acide aminé

ACh : acétylcholine

ADNc : acide désoxyribonucléique
complémentaire

ALS : sclérose latérale amyotrophique

APP : amyloid precursor protein

ATCA : acide trichloroacétique

AMPc : adénosyl monophosphate cyclique

ANT : adénine nucléotide translocase

AR : acide rétinoïque

ARNm : ARN messenger

BHE : barrière hémato-encéphalique

CAML : calcium-signal modulating cyclophilin
ligand

CD : cluster of differentiation

Col-I, IV : collagène de type I, IV

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Cn : calcineurine

CsA : cyclosporine A

CSF : liquide cébrospinal céphalorachidien

CyCAP : cyclophilin C associated protein

CyPs : cyclophilines

CyP A, B, C, D : cyclophiline A, B, C, D

DA : dopamine

DAB : diaminobenzidine

DARPP-32 : dopamine and adenosine 3',5'-
monophosphate-regulated phosphoprotein,
32 kDa

DPBS : Dulbecco's phosphate buffered saline

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : diméthyl sulfoxyde

DNF : dégénérescence neurofibrillaire

DOPAC : acide dihydroxyphénylacétique

DRG : dorsal root ganglia

ECL : enhanced chemiluminescence

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique

EGF : epidermal growth factor

ERKs : extracellular signal regulated protein
kinase

EPSP : potentiel postsynaptique excitateur

bFGF : basic fibroblast growth factor

FKBPs : FK506 binding proteins

GST : glutathione S-transferase

HTT : protéine huntingtine

HVA : acide homovanillique

ICAM : intracellular adhesion molecule

IFN- γ : interferon-gamma

IL-1, 2, 6, 8 : interleukine 1, 2, 6, 8

IP10 : interferon inducible protein 10

IP₃R : récepteur à inositol 1, 4, 5 triphosphate

JNK/SAPK : c-Jun amino-terminal
kinase/stress-activated protein kinase

Kb : kilobase

Kd : constante de dissociation

KDa : kilodalton

LCR : liquide céphalorachidien

LDL : low density lipoprotein

LTD : long-term depression

LTP : long-term potentiation

LPS : lipopolysaccharides

MA : maladie d'Alzheimer

MAP : mitogene activated protein

MAPKs : mitogene activated protein kinases

MCA : artère cérébrale médiane

MEC : matrice extracellulaire

MEM : minimum essential medium

MH : maladie de Huntington

MLCK : myosin light chain kinase

MPP+ : ion méthyl pyridinium

MPT : mitochondrial permeability transition

MPTP : N-méthyl-4-phényl-1-2-3-6-tétrahydropyridine
MM : masse moléculaire
MP : maladie de Parkinson
mTOR : mammalian target of rapamycin
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
N-CAM : neural cell adhesion molecule
NF-AT : nuclear factor of activated T-cell
NGF : nerve growth factor
NK-TR : natural killer cell tumour recognition protein
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NO : monoxyde d'azote
NOS : NO synthase
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
3-NP : acide 3-nitropropionique
6-OHDA : 6-hydroxydopamine
OPD : *o*-phénylènediamine
PARS : poly(ADP-ribose)synthétase
PBS : phosphate buffered saline
PCA : para-chloroamphétamine
PDGF : platelet derived growth factor
PDI : protéine disulfide isomérase
PGE1 : prostaglandine E1
P-gp : P-glycoprotéine
PHF : paired helical filament
pHi : point isoélectrique
PKA, C : protéine kinase A, C
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
PPIase : peptidyl prolyl *cis-trans* isomérase
PP2B : protéine phosphatase 2B
RAFT : rapamycine and FKBP12 target
Rh1, 2 : rhodopsine 1, 2
RNase : ribonucléase
RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction
RyR : ryanodine récepteur

SAB : sérum albumine bovine
SDS : sodium dodecyl sulfate
Sn : substance noire
SN : système nerveux
SNC : système nerveux central
TBI : traumatic brain injury
TBS : Tris buffer saline
TCR : T-cell receptor
TGF- β : transforming growth factor β
TH : tyrosine-hydroxylase
T β RI, II : récepteur de type I, II du TGF- β
TNF- α : tumor necrosis factor- α
TPA : 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TPR : tetratricopeptide repeat
VEGF : vascular endothelial growth factor
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Acides aminés:

A (Ala) : alanine
C (Cys) : cystéine
D (Asp) : acide aspartique
E (Glu) : acide glutamique
F (Phe) : phénylalanine
G (Gly) : glycine
H (His) : histidine
I (Ile) : isoleucine
K (Lys) : lysine
L (Leu) : leucine
M (Met) : méthionine
N (Asn) : asparagine
P (Pro) : proline
Q (Gln) : glutamine
R (Arg) : arginine
S (Ser) : sérine
T (Thr) : thréonine
V (Val) : valine
W (Trp) : tryptophane
Y (Tyr) : tyrosine

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
GENERALITES.....	5

CHAPITRE I : LES CYCLOPHILINES

I - LES CYCLOPHILINES.....	5
A - LES DIFFERENTES FORMES DE CYCLOPHILINES.....	5
1. Les formes majeures.....	5
a. La cyclophiline A.....	5
b. La cyclophiline B.....	9
c. La cyclophiline C.....	11
d. La cyclophiline D.....	11
e. La cyclophiline 40.....	12
2. Les formes mineures des cyclophilines.....	12
a. Les cyclophilines 33 et 60.....	12
b. Les cyclophilines membranaires.....	12
B - ACTIVITE PEPTIDYL PROLYL CIS/TRANS ISOMERASE (ROTAMASE).....	13
1. Isomérisation des liaisons prolyles.....	14
2. Les différentes PPIases.....	15
a. Les cyclophilines.....	15
b. Les FK506-Binding Proteins.....	16
c. Les parvulines.....	17
d. Le Trigger factor.....	17
C – IMMUNOSUPPRESSION.....	17
1. Généralités.....	17
a. Le complexe cyclophiline/cyclosporine A.....	17
b. Le complexe cyclophiline-sangliféhrine.....	19
c. Les complexes FKBP/FK506 et FKBP/rapamycine.....	19
2. Mécanisme de l'immunosuppression.....	21
a. Effets des complexes CyPA/CsA et FKBP12/FK506.....	22
b. Effets du complexe FKBP12/rapamycine.....	23
c. Effet du complexe CyPB/CsA.....	23
D – ACTIVITES BIOLOGIQUES DES CYCLOPHILINES.....	24
1. Rôle dans la biosynthèse des protéines.....	24
2. Régulation du canal mitochondrial.....	24
3. Régulation de l'activité de la CAML.....	25
4. Interactions avec la CyCAP.....	25
5. Activité nucléasique.....	25
6. Activité mitogène.....	26
7. Activité pro-inflammatoire.....	27
8. Interactions avec le HIV-1.....	28
II – INTERACTION ENTRE LA CYPB ET SES SITES DE FIXATION MEMBRANAIRES	29
A - FIXATION DE LA CYPB A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES.....	29
B - REGIONS DE LA CYPB IMPLIQUEES DANS LA FIXATION AUX DEUX TYPES DE RECEPTEURS.....	31
C - LA CYPB : NOUVEAU MEMBRE DES HBP.....	34

CHAPITRE II : LES PROTEOGLYCANNES

I – STRUCTURE DES PROTEOGLYCANNES.....	35
A – LES GLYCOSAMINOGLYCANNES.....	35
1. Les familles de glycosaminoglycannes.....	35
a. L'acide hyaluronique.....	35
b. L'héparine et les héparanes sulfates.....	35
c. Les kératanes sulfates.....	37
d. Les chondroïtanes sulfates.....	37
e. Les dermatanes sulfates.....	39
2. Biosynthèse des chaînes glycosaminoglycannes.....	39
B – LES CORES PROTEIQUES.....	42
1. Les protéoglycannes intracellulaires.....	43
2. Les protéoglycannes extracellulaires.....	44
a. La famille des hyalectanes.....	44
<i>a. L'aggrécan.....</i>	44
<i>β. Le versican.....</i>	45
<i>γ. Le neurocan.....</i>	45
<i>δ. Le brévican.....</i>	46
b. La famille des protéoglycannes riches en leucine.....	46
<i>a. La décorine.....</i>	46
<i>β. Le biglycan.....</i>	47
<i>γ. La fibromoduline.....</i>	47
<i>δ. Le lumican.....</i>	47
c. La famille du perlécan.....	48
3. Les protéoglycannes membranaires.....	48
a. Les syndécans.....	48
b. Les glypicans.....	50
c. Le CD44.....	53
d. Le bétaglycan.....	55
II - FONCTION DES PROTEOGLYCANNES.....	56
A - IMPORTANCE DES CHAINES GAGs.....	57
1. Interaction GAG/protéine.....	57
a. Protection et stockage des HBPs.....	57
b. Régulation de la diffusion des HBP.....	58
c. Présentation des HBP.....	60
d. Fixation des agents pathogènes.....	61
2. Spécificité de reconnaissance.....	62
B - IMPORTANCE DU CORE PROTEIQUE.....	65
1. Les syndécans.....	66
a. Fonctions associées aux récepteurs.....	66
b. Co-signalisation des syndécans.....	67
c. Régulation de l'expression membranaire des syndécans.....	70
2. Le CD44.....	72
a. Fonction associée aux récepteurs.....	72
b. Implication du CD44 dans la co-signalisation.....	72
c. Régulation de l'expression membranaire du CD44.....	73
3. Les glypicans.....	73
a. Fonctions associées aux récepteurs.....	73
b. Implication des glypicans dans la co-signalisation.....	74
c. Régulation de l'expression membranaire des glypicans.....	74

TRAVAUX PERSONNELS..... 77

**CHAPITRE I : ROLE DES HSPG DANS LES REPONSES CELLULAIRES
INDUITES PAR LA CYPB**

**PARTIE I : ROLES DES HEPARANES SULFATES DANS LES REPONSES INDUITES PAR LA
FIXATION DE LA CYPB SUR LES LYMPHOCYTES T**

Introduction..... 77
Article : Interaction with GAGs is required for CyPB to trigger integrin-mediated
adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix..... 79
Discussion..... 85

**PARTIE II : IMPLICATION DES SYNDECAN-1 ET -2 DANS L'ACTIVITE PRO-ADHESIVE DE
LA CYPB**

Introduction..... 89
Article : Syndecan-1 and -2 serve as co-receptors for CyPB to trigger integrin-adhesion
to fibronectin..... 91
Discussion..... 99

**CHAPITRE II : SPECIFICITE D'INTERACTION ENTRE LA CYPB ET SES
MOTIFS HEPARINIQUES**

**PARTIE I : ETUDE DU MOTIF HEPARINIQUE MINIMAL IMPLIQUE DANS LES
INTERACTIONS AVEC LA CYPB. ANALYSE PAR RETARD SUR GEL**

Introduction..... 103
Article : Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of
CyPB to heparin and cell surface heparan sulphates..... 105
Discussion..... 113

**PARTIE II : ETUDE DES CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DU MOTIF HEPARINIQUE
RECONNU PAR LA CYPB. ANALYSE PAR LA TECHNOLOGIE DU BIOCAPTEUR
IASYS**

I – INTRODUCTION..... 117
 A - PRINCIPE..... 117
 B - DETERMINATION DES PARAMETRES DE FIXATION..... 119
II – RESULTATS..... 122
 A - CINETIQUE DE FIXATION DE LA CYPB SUR HEPARINE IMMOBILISEE..... 122
 B - INFORMATION SUR LA TAILLE DU MOTIF HEPARINIQUE INTERAGISSANT AVEC LA
 CYPB..... 122
 1. Cinétiques de fixation de la CyPB sur héparine et oligosaccharides hépariniques
immobilisés..... 122
 2. Compétition de fixation de la CyPB par des oligosaccharides
hépariniques..... 122

C - ANALYSE DES CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DU MOTIF HEPARINIQUE INTERAGISSANT AVEC LA CyPB.....	125
1. Compétition de fixation de la CyPB par des héparines modifiées chimiquement.....	125
2. Expériences de <i>footprinting</i>	127
3. Mise en évidence de l'implication des groupements aminés libres de l'héparine dans l'interaction avec la CyPB.....	129
III - DISCUSSION.....	129
IV - MATERIELS ET METHODES.....	134
1. Biotinylation de l'héparine et des oligosaccharides dérivés d'héparine.....	134
2. Réalisation des cuvettes.....	134
3. Mesure des cinétiques de fixation.....	135
4. Analyse des paramètres de fixation.....	137
5. Expériences de compétition de fixation.....	137
CONCLUSION.....	138
BIBLIOGRAPHIE.....	143

Introduction

La thématique générale de l'équipe de recherche dirigée par le Dr. J. Mazurier concerne la régulation du cancer et de la réaction inflammatoire par les glycoconjugués. Dans cette équipe, nous nous intéressons plus particulièrement aux rôles des protéoglycannes dans l'activité des facteurs inflammatoires. Par leurs propriétés communes avec les chimiokines et certaines cytokines, il a été suggéré que les cyclophilines sécrétées pouvaient être impliquées dans le recrutement des cellules de l'inflammation. Dans ce contexte, le travail de thèse qui m'a été confié concerne le rôle des protéoglycannes à chaînes héparanes sulfates (HSPG) dans la fixation et les réponses cellulaires induites par les cyclophilines.

Ces protéines appartiennent avec les FKBP (FK506-binding proteins) à la grande famille des immunophilines. La cyclophiline A (CyPA), premier membre de la famille des cyclophilines, fut identifiée comme le principal récepteur intracellulaire de la CsA. Les cyclophilines ont ensuite été décrites comme des peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérases (PPIases), ce qui a laissé penser qu'elles étaient prioritairement impliquées dans la mise en conformation de protéines. Outre leur localisation intracellulaire, les CyPA et CyPB ont également été mises en évidence dans les liquides biologiques humains comme le lait et le plasma. Leur concentration plasmatique augmente en réponse à certains stimuli inflammatoires, suggérant que les cyclophilines extracellulaires puissent agir comme des facteurs de l'inflammation. Les premières réponses cellulaires relatives à la CyPA extracellulaire ont d'ailleurs mis en évidence une activité inflammatoire *in vivo* et une activité chimioattractante *in vitro* pour les monocytes, les neutrophiles du sang ainsi que pour les éosinophiles et les neutrophiles obtenus par différenciation des cellules HL-60.

La caractérisation par notre Laboratoire d'une forme sécrétée de CyPB dans le lait et le plasma a conduit à rechercher d'éventuelles interactions avec les éléments figurés du sang. Deux sites de fixation de haute affinité ont été caractérisés à la surface des lymphocytes T. Un site protéique (site de type I) représentant le récepteur fonctionnel et un site correspondant à des héparanes sulfates membranaires (sites de type II). A l'aide de protéines modifiées par mutagenèse dirigée, les sites d'interaction avec les deux types de récepteur ont été localisés de part et d'autre de la molécule de CyPB, suggérant que celle-ci est capable d'interagir simultanément avec ses deux types de site. L'existence de deux sites de fixation est une propriété que la CyPB partage avec de nombreux facteurs inflammatoires, renforçant l'hypothèse d'un rôle de la CyPB dans les processus inflammatoires. Comme pour la majorité des HBP (*Heparin Binding Protein*), les sites glycaniques pourraient jouer un rôle en stabilisant les interactions entre la CyPB et son récepteur protéique, et par conséquent conduire à des signaux soutenus. En

outre, des travaux récents suggèrent que les HSPG interviendraient également dans la génération de signaux intracellulaires.

L'ensemble de nos travaux de thèse a été regroupé en deux chapitres. Le premier concerne nos résultats sur l'étude du rôle des HSPG dans l'activité pro-adhésive de la CyPB. En comparant les activités de la CyPA (isoforme incapable de se fixer aux sites glycaniques) et de la CyPB, nous avons montré que les chaînes héparanes sulfates sont nécessaires à l'augmentation d'adhésion des lymphocytes T à la fibronectine. Nous avons ensuite analysé l'expression des différents HSPG à la surface des cellules HL-60 différenciées en neutrophiles (HL-60/neutrophiles) et caractérisé l'implication des syndécan-1 et -2 dans la fixation et l'activité pro-adhésive de cette protéine.

Dans le second chapitre, nous présentons nos travaux sur l'étude de la spécificité d'interaction entre la CyPB et ses motifs hépariniques. Nous avons déterminé la taille minimale du motif nécessaire à l'interaction avec la CyPB grâce à une méthode visuelle de retard sur gel en électrophorèse non dénaturante. Après avoir démontré l'importance de la taille des oligosaccharides, nous avons précisé le rôle de certains groupements de l'héparine responsables de la spécificité de fixation de la CyPB en utilisant la technologie des biocapteurs IA Sys.

Une partie de mes travaux a fait l'objet de deux articles publiés et de deux articles soumis à publication :

Fabrice Allain, **Christophe Vanpouille**, Mathieu Carpentier, Marie-Christine Slomianny, Sandrine Durieux and Geneviève Spik (2002) Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 2714-2719

Mathieu Carpentier, Fabrice Allain, Marie-Christine Slomianny, Sandrine Durieux, **Christophe Vanpouille**, Bernard Haendler and Geneviève Spik (2002) Receptor type I and type II binding regions and the peptidyl-prolyl isomerase site of CyPB are required for enhancement of T-lymphocytes to fibronectin. *Biochemistry* **41**, 5222-5229

Christophe Vanpouille, Agnès Denys, Rachel Pakula, Joël Mazurier and Fabrice Allain. Syndecan-1 and -2 serve as co-receptors for cyclophilin B to trigger integrin-mediated cell adhesion to fibronectin. Soumis à *Molecular Biology of the Cell*

Christophe Vanpouille, Agnès Denys, Mathieu Carpentier, Rachel Pakula, Joël Mazurier and Fabrice Allain. Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of

cyclophilin B to heparin and cell surface heparan sulphate. Soumis à *Biochemical Journal*

Ces travaux ont également été présentés dans des congrès nationaux et internationaux :

- communications orales

Christophe Vanpouille, Fabrice Allain, Mathieu Carpentier, Marie-Christine Slomianny and Geneviève Spik. Structure and functions of CyPB binding sites. *Workshop on Heparan Sulphate, 01-05 october 2000, Berlin-Buch*

Christophe Vanpouille, Maryse Delehedde, Agnès Denys, Marie-Christine Slomianny, David.G Fernig and Fabrice Allain. Analysis of the specific CyPB-heparin interaction by an optical biosensor method. *22 janvier 2002, Christie Hospital, University of Manchester, M 204BX, Manchester UK*

Fabrice Allain, **Christophe Vanpouille**, Agnès Denys, Mathieu Carpentier and Joël Mazurier. Involvement of GAGs in the activity of pro-inflammatory factors. *6th Jenner of Glycobiology and Medicine Symposium, 14-17 septembre 2002, Seillac*

- communications par affiche

Mathieu Carpentier, **Christophe Vanpouille**, Fabrice Allain, Marie-Christine Slomianny and Geneviève Spik. Determination of structural features of glycosaminoglycans interacting with cyclophilin B. *12th Joint Meeting, 5-7 novembre 2000, Lille*

Christophe Vanpouille, Fabrice Allain, Mathieu Carpentier, Marie-Christine Slomianny et Geneviève Spik. La Cyclophiline B possède une activité de type chimiokine pour les HL-60/neutrophiles. *XXVIIIème Forum des Jeunes Chercheurs, 3-7 septembre 2001, Strasbourg*

Christophe Vanpouille, Maryse Delehedde, Agnès Denys, Marie-Christine Slomianny, John T. Gallagher, Joël Mazurier, Malcolm Lyon, David G. Fernig and Fabrice Allain. CyPB-mediated adhesion of HL-60/neutrophils requires functional interactions with specific heparan sulphate proteoglycans. *Gordon's Conferences on Proteoglycans, 05-12 juillet 2002, Andover (New-Hampshire)*

Agnès Denys, **Christophe Vanpouille**, Maryse Delehedde, Marie-Christine Slomianny, John T. Gallagher, Joël Mazurier, Malcolm Lyon, David G Fernig. and Fabrice Allain. CyPB-

mediated adhesion of HL-60/neutrophils requires functional interactions with specific heparan sulphate proteoglycans. *6th Jenner of Glycobiology and Medicine Symposium, 14-17 septembre 2002, Seillac*

Mathieu Carpentier, **Christophe Vanpouille**, Fabrice Allain, Marie-Christine Slomianny and Geneviève Spik. Determination of structural features of glycosaminoglycans interacting with cyclophilin B. *6th Jenner of Glycobiology and Medicine Symposium, 14-17 septembre 2002, Seillac*

Rachel Pakula, **Christophe Vanpouille**, Agnès Denys, Mathieu Carpentier, Joël Mazurier and Fabrice Allain. Involvement of HSPG in CyPB-mediated adhesion of T-lymphocytes to the extracellular matrix. *6th Jenner of Glycobiology and Medicine Symposium, 14-17 septembre 2002, Seillac*

Christophe Vanpouille, Agnès Denys, Marie-Christine Slomianny, Rachel Pakula, Joël Mazurier et Fabrice Allain. Implication des protéoglycannes membranaires de type héparane sulfate dans l'activité pro-adhésive de la CyPB. *IIème Journée André Verbert, 19 septembre 2002, Lille*

L'implication des HSPG dans l'activité des facteurs inflammatoires a également fait l'objet de deux revues générales :

Maryse Delehedde, Fabrice Allain, Sarah J. Payne, Raphaëlle Borgo, **Christophe Vanpouille**, Dave G. Fernig and Elisabeth Deudon (2002) Proteoglycans in inflammation. *Curr. Med. Chem. - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* **1**, 89-102

Fabrice Allain, **Christophe Vanpouille**, Agnès Denys, Rachel Pakula, Mathieu Carpentier and Joël Mazurier (2003) Involvement of GAGs in the activity of pro-inflammatory factors. *Glycobiology and Medicine, ed. J.S. Axford, Kluwer Academic, New York*, pp 95-106

Généralités

CHAPITRE I

Les cyclophilines

Les cyclophilines sont des protéines ubiquitaires ayant une large distribution phylogénétique. Elles forment avec les FKBP (FK506-binding proteins) la grande famille des immunophilines. Ces deux familles de protéines, bien que possédant une structure différente, partagent deux propriétés communes : une activité peptidyl prolyl *cis/trans* isomérase (PPIase) et la capacité à fixer des immunosuppresseurs. La classe des immunosuppresseurs permet de distinguer les cyclophilines, capables de fixer la cyclosporine A (CsA), et les FKBP, capables de fixer le FK506 et la rapamycine (Schreiber, 1991 ; Ryffel, 1993 ; Galat, 1999 ; Galat, 2000).

I - LES CYCLOPHILINES

A - LES DIFFERENTES FORMES DE CYCLOPHILINES

1. Les formes majeures

a. La cyclophiline A

La CyPA a été purifiée pour la première fois à partir d'extraits cytosoliques de thymocytes de bœuf (Handschumacher *et al.*, 1984). Elle a ensuite été décrite chez de nombreuses espèces, où elle a été mise en évidence dans tous les tissus à des concentrations élevées. Elle fut décrite comme le premier récepteur de la CsA, suggérant qu'elle puisse jouer un rôle crucial dans le mécanisme immunosuppresseur de ce médicament (Harding & Handschumacher, 1988). Elle fut également décrite comme la première protéine à activité peptidyl prolyl *cis/trans* isomérase (Fischer *et al.*, 1989 ; Takahashi *et al.*, 1989).

La première séquence protéique a été réalisée pour la CyPA bovine par méthode chimique (Harding *et al.*, 1986). En 1987, Haendler *et al.* ont cloné l'ADN complémentaire de la CyPA humaine à partir de la lignée lymphoblastique Jurkat. La CyPA a ensuite été clonée chez le rat (Danielson *et al.*, 1988) et la souris (Hasel & Sutcliffe, 1990), où la protéine décrite possède plus de 90% d'homologie de séquence avec la CyPA bovine et humaine. Chez l'Homme, le gène codant pour la CyPA a été localisé au niveau de la bande 13 du chromosome 7 (Haendler & Hofer, 1990 ; Willenbrink *et al.*, 1995 ; Braaten *et al.*, 1996a). Il est composé de 5 exons et 4 introns. L'ARNm de la CyPA code pour une protéine de 165 acides aminés (MM = 18 kDa) (Figure 1), généralement représentée par deux isoformes : une forme mineure de pHi 6,8 et une forme majeure de pHi 8,6 (Harding *et al.*, 1986 ; Tropschung *et al.*, 1988 ; Haendler *et al.*, 1989 ; Bergsma *et al.*, 1991).

	1	10	20	30	40	50			
CyPA				MVNP	TVFFDIA	VDGEPLGRVSFEL	FADKV	PKTAENFRALST	GEKGF
CyPB		MKVLLAAALIAGSVFFLLLPGPSAADEKKK	GPKVTV	KVYFDLR	IGDEDVGRVIFGL	FGKTV	PKTVDNFVALAT	GEKGF	
CyPC		MGPGRPRLLLPLVLCVGLGALVFSSGAE	GFRKR	GPSVTA	KVFFDVR	IGDKDVGRIVIGL	FGKVV	PKTVENFVALAT	GEKGY
CyPD	MLALRCGSRWLGLLSVPRSVPLRLPAARACSKGSGDPSSSS	SSSGTV	LVYLDVD	ANG	KPLGRVLEL	KADV	PKTAENFRALCT	GEKGF	
	60	70	80	90	100	110	120	130	140
CyPA	GYK <u>GSC</u> FHRI <u>I</u> <u>PGF</u> MCQGGD FTRHNGTGGK <u>SIY</u> GEKFEDEFILK HTGPGILS MANAGPNTNGS QFFICTAKT EWL DGKH VVFGKVKEGM								
CyPB	GYK <u>NSK</u> FHRV <u>IKDF</u> MIQGGD FTRGDGTGGK <u>SIY</u> GERFPDENFKLK HYGPGWVSM ANAGKDTNGS QFFIT TVK TAWL DGKH VVFGKVL EGM								
CyPC	GYK <u>G</u> GEK FHRV <u>IKDF</u> MIQGGD IITGDGTGGV <u>SIY</u> GETFPDENFKLK HYGIGWVSM ANAGPNTNGS QFFICTAKT EWL DGKH VVFGKVID GM								
CyPD	GYK <u>G</u> ST FHRV <u>I</u> PSF MCQAGD FTNHNGTGGK <u>SIY</u> GSRFPDENFTLK HVGPVLSM ANAGPNTNGS QFFICTI KT DWL DGKH VVFGHVKEGM								
	150	160	170	180					
CyPA	NIVEAME -RFGSRNGKTSKK ITIADCGQLE							feuillet β	
CyPB	EVRKVE STKTDSRDKPLKD VIIADCGKIE VEKP FALAKE							coude β	
CyPC	TVVHSIE LQATDGHDRPLTN CSIINSGKID VKTP FVVEIADW							hélice α	
CyPD	DVVKKIE -SFGSKSGRTSKK IVITDCGQLS							hélice 3₁₀	

Figure 1 : Structures primaire et secondaire des CyPA, CyPB, CyPC et CyPD
(Bergsma *et al.*, 1991 ; Ke, 1992 ; Ke *et al.*, 1993 ; Mikol *et al.*, 1994)

La conformation de la CyPA, initialement déterminée par diffraction des rayons X, correspond à l'archétype des cyclophilines. Schématiquement, la CyPA forme le noyau commun des cyclophilines sur lequel viennent se greffer les extensions N- et C-terminales spécifiques des autres membres de la famille. La CyPA adopte une conformation en tonneau β formé par 8 feuillettes β antiparallèles, délimitant un cylindre dont les ouvertures supérieure et inférieure sont verrouillées par deux hélices α (Ke *et al.*, 1991 ; Ke, 1992). Une troisième hélice de type 3_{10} , plus courte, se positionne latéralement au tonneau β . La conformation de la CyPA présente également de nombreux coudes β qui connectent les hélices et les feuillettes β entre eux (Figure 2).

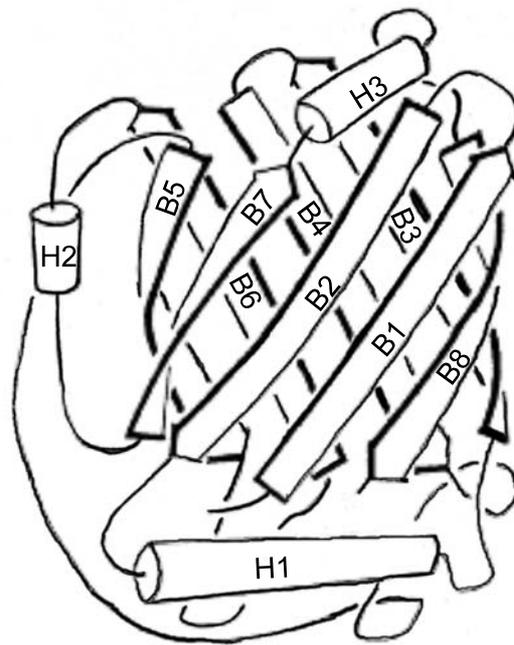


Figure 2 : Représentation schématique de la structure de la CyPA. Les hélices sont numérotées de H1 à H3 et les feuillettes de B1 à B8 (Ke, 1992).

La CyPA représente 0,1 à 0,4% des protéines totales d'une cellule (Harding *et al.*, 1986). Elle est particulièrement abondante dans le cerveau, les reins, les parotides et les cellules du sang (Marks *et al.*, 1991). Sarris *et al.* (1992) ont montré que la différenciation respective des souches érythroïdes et myéloblastiques en érythrocytes et granulocytes s'accompagne d'une diminution du taux de CyPA, suggérant que les cellules en prolifération ont un taux de CyPA plus élevé que les cellules différenciées. La CyPA est surexprimée dans tous les tissus néoplasiques (Koletsky *et al.*, 1986) ainsi que dans le placenta et les tissus décidaux durant le premier trimestre de grossesse (Meier *et al.*, 1995). La CsA peut également moduler l'expression de la CyPA. Les

animaux traités au médicament présentent en effet une augmentation généralisée du taux de CyPA excepté au niveau du cerveau (McDonald *et al.*, 1992). Toutefois, Hovland *et al.* (1999) ont montré que la CsA augmente la quantité de CyPA sans changement dans l'expression du gène dans les neuroblastomes murins différenciés ou non par la prostaglandine. Enfin, d'autres facteurs extérieurs aux cellules comme la concanavaleine A entraînent une augmentation du taux de CyPA. Cette augmentation est inhibée en présence d'acide okadaïque, un inhibiteur des protéines phosphatases PP1 et PP2A (Richards *et al.*, 1992), suggérant que l'expression de CyPA est probablement sous le contrôle de ces deux phosphatases.

La CyPA est principalement localisée au niveau du cytosol (Handschumacher *et al.*, 1984 ; Harding *et al.*, 1986 ; Ryffel *et al.*, 1991 ; McDonald *et al.*, 1992 ; Sarris *et al.*, 1992). Toutefois, de nombreux auteurs ont décrit sa présence dans d'autres compartiments subcellulaires, tels que la mitochondrie (Ryffel *et al.*, 1991), le réticulum endoplasmique (McDonald *et al.*, 1992), l'appareil de Golgi (Sarris *et al.*, 1992) et le noyau (Ryffel *et al.*, 1991 ; Azhderian *et al.*, 1993 ; Le Hir *et al.*, 1995). La présence de la CyPA dans ces compartiments est controversée. Cependant, Montague *et al.* (1994) ont caractérisé dans le noyau l'activité nucléasique d'une cyclophiline de 18 kDa, la NUC 18 qui serait impliquée dans les mécanismes apoptotiques. De même, Krummrei *et al.* (1995) ont montré que la CyPA serait présente dans le noyau des macrophages de souris et se fixerait sur l'ADN en se complexant au zinc. Sa localisation nucléaire a enfin été confirmée par immunolocalisation (Le Hir *et al.*, 1995). Les autres localisations discutées de la CyPA s'expliqueraient probablement par des réactions croisées dans les expériences d'immuno-détection. Des isoformes de cyclophilines, présentant de fortes homologues de séquence avec la CyPA (voir ci-après) ont en effet été identifiées dans les compartiments subcellulaires cités précédemment.

Bien que son ARNm ne code pas pour un peptide signal qui dirigerait la protéine vers l'espace extracellulaire, la CyPA a également été détectée dans différents liquides biologiques. La CyPA a effectivement été mise en évidence par dosage de l'activité PPIase dans le plasma de patients souffrant de septicémie grave (Tegeder *et al.*, 1997) et dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Billich *et al.*, 1997). Sherry *et al.* (1992) ont montré que des macrophages murins stimulés par des lipopolysaccharides (LPS) sécrétaient une protéine de 18 kDa, la Sp 18 dont l'analyse séquentielle démontre une forte homologie avec celle de la CyPA. Parallèlement, lors de l'analyse et la purification de facteurs chimiotactiles pour les éosinophiles, Xu *et al.* (1992) ont identifié une protéine de 18 kDa dont la séquence N-terminale est identique à celle de la CyPA. Plus récemment, Jin *et al.* (2000) ont montré que la CyPA était sécrétée *in vitro* par les cellules de muscle lisse vasculaire dans des conditions de stress oxydatif

ainsi que dans un modèle *in vivo* de dommage vasculaire. Ces observations suggèrent que la CyPA peut être sécrétée dans certaines conditions inflammatoires ou de stress oxydatif. L'absence de peptide signal codé par l'ARNm de la CyPA n'est pas un argument suffisant pour exclure sa sécrétion puisque d'autres protéines comme les FGF (*Fibroblast Growth Factor*)-1 et -2 ou l'interleukine-1 β (IL-1 β), également dépourvues de peptide signal, sont indiscutablement sécrétées (Nickel, 2003). D'autre part, le CD147 a récemment été identifié comme un récepteur membranaire de la CyPA, confirmant que celle-ci peut agir comme un médiateur extracellulaire (Pushkarsky *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002).

b. La cyclophiline B

La cyclophiline B (CyPB) est le second membre des cyclophilines à avoir été décrit. En 1991, Price *et al.* ont identifié son ADNc en criblant une banque issue de cellules lymphoblastiques Jurkat à l'aide d'une sonde oligonucléotidique correspondant à la séquence conservée des cyclophilines. Chez l'Homme, le gène de la CyPB existe en une copie unique présent sur le chromosome 15 (Peddada *et al.*, 1992). La CyPB mature compte 184 acides aminés (MM = 21 kDa). Elle présente 65% d'homologie de séquence avec la CyPA mais se distingue par la présence d'extrémités N- et C-terminales spécifiques comportant chacune un feuillet β (Figure 1). Son ARNm code pour un peptide signal qui permet la translocation de la protéine dans les vésicules du réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion. Par exemple, le traitement de cellules pituitaires de rat avec l'oestradiol, l'insuline ou l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) provoque une accumulation importante de la protéine dans la voie de sécrétion, sans changement de son taux d'expression (Lee *et al.*, 2000). Le peptide signal comporte 25 acides aminés et est absent de la protéine mature (Bergsma *et al.*, 1991 ; Caroni *et al.*, 1991 ; Price *et al.*, 1991 ; Spik *et al.*, 1991). Le point isoélectrique de la CyPB est 9,6, ce qui lui confère une avidité forte pour des échangeurs de cations tels que l'ADN et l'héparine (Galat & Bouet, 1994).

La CyPB est une protéine à large répartition tissulaire avec une abondance particulière dans le foie, le cerveau (Galat & Bouet, 1994) et les tissus embryonnaires (Caroni *et al.*, 1991 ; Zeng *et al.*, 1998). Son expression est toutefois 5 à 10 fois inférieure à celle de la CyPA. Elle est majoritairement colocalisée avec la calréticuline dans des vésicules du réticulum endoplasmique spécialisées dans le stockage du calcium, les calciosomes (Arber *et al.*, 1992). Dans les cellules du muscle strié, la CyPB est présente dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique avec la calséquestrine (Arber *et al.*, 1992). La présence de CyPB dans le noyau est plus controversée (Hasel *et al.*, 1991 ; Le Hir *et al.*, 1995). Nagata *et al.* (2000) ont toutefois décrit

dans des thymocytes activés par des anticorps anti-CD3 un passage de la CyPB depuis la fraction microsomale vers la fraction cytosolique/nucléaire.

La CyPB a également été retrouvée sous une forme sécrétée dans des surnageants de culture de cellules embryonnaires de Poulet (Caroni *et al.*, 1991), dans le lait de femme (Spik *et al.*, 1991) et dans le plasma humain (Allain *et al.*, 1995). Par méthode ELISA, la concentration plasmatique de la CyPB a été estimée à 150 ± 80 ng/ml (7 ± 4 nM) (Allain *et al.*, 1995). La CyPB est sécrétée de façon constitutive par des chondrocytes en culture (De Ceuninck *et al.*, 2003) ou par des cellules vasculaires du muscle lisse en réponse à un stress oxydatif (Liao *et al.*, 2000).

Le mécanisme de rétention de la CyPB dans le réticulum endoplasmique ou de sécrétion n'est pas très clair. En effet, la CyPB ne possède ni de séquence KDEL caractéristique de la rétention dans le réticulum endoplasmique, ni de domaine transmembranaire. Il semble que la CyPB soit retenue dans le réticulum endoplasmique par son extrémité C-terminale VEKPFAlAKE. En effet, en remplaçant l'extrémité C-terminale de la nexine, protéine normalement sécrétée, par celle de la CyPB, Arber *et al.* (1992) ont observé la colocalisation de cette protéine avec la CyPB endogène. D'autre part, il a été mis en évidence par spectrométrie de masse que la CyPB du lait de femme correspond à une forme tronquée dépourvue des cinq derniers résidus C-terminaux AlAKE. Cela suggère que cette séquence est suffisante pour la rétention dans le réticulum endoplasmique (Mariller *et al.*, 1996). Toutefois, en présence de CsA, la sécrétion de CyPB est fortement augmentée (Denys *et al.*, 1998a ; De Ceuninck *et al.*, 2003), suggérant que l'immunosuppresseur entre en compétition avec les ligands naturels de la CyPB dans le réticulum endoplasmique (Price *et al.*, 1994). Puisque la CsA se fixe au noyau central des cyclophilines (Hsu *et al.*, 1990), il apparaît que la partie C-terminale de la CyPB n'explique pas à elle seule sa rétention dans le réticulum endoplasmique.

Des sites de fixation de la CyPB ont été caractérisés sur les lymphocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales (Allain *et al.*, 1994 ; Allain *et al.*, 1999 ; Carpentier *et al.*, 1999a). Plus tard, Denys *et al.* (1998b) ont montré que coexistaient en fait deux types de site de fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T circulants. Le premier, appelé site de type I, est de nature protéique alors que le deuxième correspond à des protéoglycannes à chaînes héparanes sulfates. Par des expériences de compétition avec les différentes cyclophilines et les peptides N- et C-terminaux de la CyPB, Denys *et al.* (1998b) ont montré que les régions d'interaction avec les sites de type I et de type II se situent respectivement dans le noyau central et dans la partie N-terminale de la CyPB.

c. La cyclophiline C

La cyclophiline C (CyPC) a été clonée pour la première fois à partir d'une banque de cellules stromales de moelle épinière de Souris. Son ARNm est présent en grande quantité dans le rein. A l'inverse, de faibles taux sont détectables dans la rate, les lymphocytes B et T. Après traitement à la CsA, le taux de CyPC est augmenté, suggérant un rôle de cette protéine dans la néphrotoxicité induite par le médicament (Friedman & Weissman, 1991 ; Otsuka *et al.*, 1994). La CyPC humaine fut clonée à partir de cellules rénales dont elle était censée être spécifique. Contrairement à son isoforme murine, son expression ne se limite pas au rein, ce qui vient en contradiction avec l'hypothèse de son implication dans la néphrotoxicité chez l'Homme. Son ARNm fut en effet détecté dans tous les tissus testés (rein, muscles lisses ou striés, pancréas, cœur, poumon et foie) à un taux 10 fois plus faible que celui de la CyPA (Schneider *et al.*, 1994). Elle est moins représentée dans le cerveau et les cellules lymphoblastiques Jurkat.

La CyPC est une protéine de 212 acides aminés (PM = 22,8 kDa) de pHi égal à 7,4. Elle possède respectivement 48% et 70% d'homologie avec la CyPA et la CyPB (Figure 1). La structure de la CyPC est très similaire à celle de la CyPA avec, comme pour la CyPB, un feuillet β supplémentaire à chacune de ses extrémités N- et C-terminales. D'autre part, la séquence N-terminale de la CyPC est également riche en acides aminés hydrophobes caractéristiques d'un peptide signal dirigeant la protéine vers le réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion (Ke *et al.*, 1993 ; Ohe *et al.*, 1996).

d. La cyclophiline D

La cyclophiline D (CyPD ou hCyP3) a été isolée suite à un criblage d'une banque d'ADNc de cellules Jurkat et d'hépatocytes humains à l'aide d'une sonde dégénérée de CyPA (Bergsma *et al.*, 1991). Son gène est représenté en une seule copie dans le génome. Elle possède 76% d'homologie avec la CyPA et 62% avec la CyPB (Figure 1). Son ARNm code pour une protéine de 207 acides aminés (MM = 22 kDa). Toutefois, la CyPD possède une masse effective de 18 kDa. L'analyse de l'extrémité N-terminale de la CyPD montre que la différence de poids moléculaire est due à la présence d'une séquence signal. La protéine est d'ailleurs retrouvée associée à la matrice mitochondriale (Connern & Halestrap, 1992 ; Inoue *et al.*, 1993 ; Woodfield *et al.*, 1997). La CyPD est exprimée dans tous les tissus à des taux 50 à 100 fois inférieurs à ceux de la CyPA.

e. La cyclophiline 40

La cyclophiline 40 (CyP40) est une seconde cyclophiline cytosolique, différente de la CyPA, qui fut isolée par chromatographie d'affinité sur CsA immobilisée à partir d'un homogénat de cerveau de Veau. Comme dans le cas de la CyPA, deux isoformes coexistent. Toutefois ceux de la CyP40 ont des points isoélectriques acides (5,3 et 5,5) (Kieffer *et al.*, 1992).

L'ADNc de la CyP40 code pour une protéine de 370 acides aminés composée de plusieurs domaines :

- Un domaine N-terminal qui présente 64% d'homologie de séquence avec la CyPA. Ce domaine porte le site PPIase et le site de fixation de la CsA,

- Un domaine C-terminal qui possède 30% d'homologie de séquence avec une autre immunophiline, la FKBP52. La CyP40 et la FKBP52 ont en effet en commun un domaine de trois unités répétées de 34 résidus d'acides aminés, nommées motifs tétratricopeptides (TPR), suivi d'un site potentiel de fixation à la calmoduline. Ces deux protéines se lient à la Hsp90 par leurs domaines communs TPR et sont associées à la forme inactive des récepteurs des stéroïdes (Kieffer *et al.*, 1993 ; Ratajczak *et al.*, 1993 ; Hoffman & Handschumacher, 1995 ; Ratajczak & Carello, 1996).

La CyP40 a été retrouvée en quantité similaire dans une grande variété de tissus humains avec toutefois un taux d'expression important dans le cœur, le thymus et le cerveau (Kieffer *et al.*, 1993 ; Ratajczak *et al.*, 1993). Sa localisation cytosolique a été confirmée par l'utilisation d'anticorps spécifiques (Yokoi *et al.*, 1996).

2. Les formes mineures des cyclophilines

a. Les cyclophilines 33 et 60

Les cyclophilines 33 et 60 (CyP33, CyP60), respectivement de masse moléculaire 33 et 60 kDa, sont des isoformes à localisation nucléaire (Mi *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 1996). La CyP33 comprend un domaine N-terminal de fixation à l'ARN et un domaine C-terminal portant une activité PPIase et présentant 40% d'homologie avec la séquence de la CyPA. La CyP33 existe en fait sous deux isoformes de 30 et 33 kDa. Néanmoins, seule l'isoforme de 33 kDa est capable de se complexer à l'ARN (Mi *et al.*, 1996).

b. Les cyclophilines membranaires

Le produit du gène *nina A* de *Drosophila melanogaster* code pour une protéine de 237 acides aminés qui partage 42% d'homologie de séquence avec la CyPA humaine. La protéine Nina A est uniquement exprimée dans les cellules photoréceptrices et surtout dans celles

possédant les photorécepteurs R1-R6. Les mutations affectant le gène *nina A* réduisent le taux de rhodopsine Rh1 et Rh2 dans les photorécepteurs R1-R6, suggérant que la protéine Nina A est impliquée dans la stabilité ou le transport de la rhodopsine (Schneuwly *et al.*, 1989 ; Shieh *et al.*, 1989). Nina A est une protéine membranaire intégrale qui présente une séquence signal provoquant sa translocation vers le réticulum endoplasmique et une séquence C-terminale hydrophobe permettant son ancrage dans des structures membranaires. Le domaine cyclophiline serait alors dirigé vers la lumière du réticulum et pourrait jouer un rôle dans la mise en conformation de Rh1 et Rh2 (Stammes *et al.*, 1991).

Le NK-TR (*Natural Killer Cell Tumour Recognition*) est une protéine membranaire de 150 kDa exprimée par les cellules NK, certains lymphocytes T cytotoxiques et les monocytes activés. Le NK-TR est non glycosylé et comprend :

- un domaine N-terminal hydrophobe permettant l'ancrage transmembranaire,
- un domaine présentant 50% d'homologie de séquence avec les cyclophilines,
- trois domaines RS, riches en résidus arginine et sérine, qui forment une région fortement chargée positivement permettant généralement l'interaction avec les ARNm,
- trois domaines présentant des homologies de séquence avec une phosphoprotéine nucléolaire de 140 kDa, Nopp 140 (Anderson *et al.*, 1993).

Le NK-TR est impliqué dans des phénomènes de différenciation cellulaire et dans la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules cytolytiques (Frey *et al.*, 1991 ; Chambers *et al.*, 1994 ; Rinfret *et al.*, 1994 ; Giardina *et al.*, 1996).

La RS-cyclophiline est une protéine de 89 kDa composée d'un domaine N-terminal homologue aux cyclophilines, de deux domaines Nopp140 et d'un domaine RS. La séquence et l'organisation multidomaine de cette protéine sont fortement homologues à celles du NK-TR. L'homologie de séquence pour le domaine cyclophiline atteint 70 %. Contrairement au NK-TR, la RS-cyclophiline présente une large distribution tissulaire (Nestel *et al.*, 1996).

B - ACTIVITE PEPTIDYL PROLYL *CIS/TRANS* ISOMERASE (ROTAMASE)

L'ensemble des PPIases se compose de deux familles principales : les cyclophilines et les FKBP, ainsi que de deux familles secondaires, les parvulines et le *Trigger Factor*. Les cyclophilines et les FKBP, qui se complexent à des immunosuppresseurs, ont été rassemblés sous le terme d'immunophilines par opposition aux autres PPIases pour lesquelles aucun immunosuppresseur n'est connu.

1. Isomérisation des liaisons proyles

Les résidus de proline, dont le taux varie dans les protéines de 0 à 30 % avec une moyenne de 6,5 %, forment une liaison prolyle qui entraîne des restrictions de conformation dans les structures II^{aire} et III^{aire} des protéines. Les résidus de proline sont principalement trouvés dans les segments cassant les hélices α , dans les coudes β ainsi que dans les structures désorganisées (Galat & Metcalf, 1995). Durant la synthèse protéique, les liaisons peptidiques qui impliquent un résidu proline sont en conformation *trans*, alors que dans la structure tridimensionnelle conformée des protéines, 15% de ces liaisons sont retrouvées en conformation *cis*.

L'isomérisation *cis-trans* de la liaison peptidyl-prolyle des prolines est catalysée par des peptidyl prolyl *cis/trans* isomérases (PPIases) (Figure 3) (Fisher, 1994).

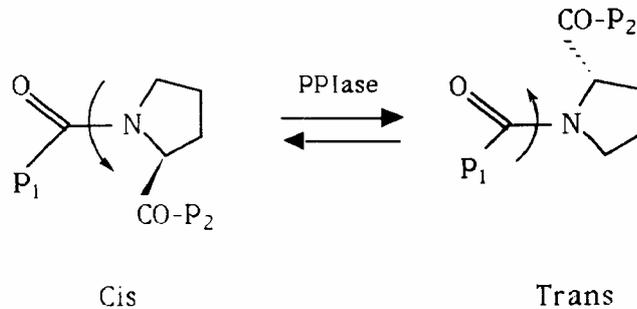


Figure 3 : Isomérisation *cis-trans* de la liaison prolyle

Cette réaction est différente de la plupart des autres réactions enzymatiques car aucune liaison covalente n'est ni établie, ni rompue, aucun intermédiaire réactionnel n'est observable et aucun cofacteur ne semble requis. L'isomérisation de la liaison prolyle repose sur une diminution transitoire de son caractère de double liaison.

L'isomérisation des liaisons peptidyl-prolyles de *cis* en *trans* est l'une des étapes déterminantes dans le repliement correct des protéines. Par conséquent, en raison de leur structure très conservée au cours de l'évolution et de leur large distribution tissulaire, il a été suggéré que les cyclophilines et les FKBP's pouvaient jouer un rôle majeur dans la mise en conformation des protéines néosynthétisées (Lang *et al.*, 1987 ; Ivery, 2000).

2. Les différentes PPIases

a. Les cyclophilines

La première protéine possédant une activité PPIase a été isolée du rein de Porc et fut ensuite identifiée à la CyPA (Fischer *et al.*, 1984). Les autres membres des cyclophilines découverts après la CyPA ont également été décrits comme des PPIases. De nombreuses études *in vitro* ont ainsi montré que les cyclophilines accélèrent l'isomérisation des liaisons prolyles et catalysent le repliement des protéines et/ou leur renaturation (Tableau I). Le domaine catalytique est porté par le noyau commun des cyclophilines, expliquant pourquoi l'activité enzymatique est fortement inhibée en présence de CsA.

Tableau I : Protéines dont le repliement est accéléré par les cyclophilines

PPIases	Protéines	Références
CyPA	Ribonucléase A	Fischer & Bang, 1985 Lang <i>et al.</i> , 1987
CyPA	Ribonucléase T1 <i>d'Aspergillus oryzae</i>	Lin <i>et al.</i> , 1988 Schönbrunner & Schmid, 1992
CyPA	Cytochrome C	Lin <i>et al.</i> , 1988
CyP cytosolique	UDP-Gal 4 épimérase de <i>Kuyveromyces fragilis</i>	Dutta <i>et al.</i> , 1997
CyPA	Créatine kinase	Yang <i>et al.</i> , 1997 Huang & Zhou, 2000
CyPA	Nucléase de Staphylocoque	Veeraraghavan <i>et al.</i> , 1997
CyPA, NK-TR,	Anhydrase carbonique II	Freskgard <i>et al.</i> , 1992 Kern <i>et al.</i> , 1995 Rinfret <i>et al.</i> , 1994
CyPA	Collagène III	Bächinger, 1987
CyPA	Procollagène IV	Davis <i>et al.</i> , 1989
CyPA	Calcitonine	Kern <i>et al.</i> , 1993
CyPA	Fragment Fab des immunoglobulines	Lilie <i>et al.</i> , 1993
CyPA	Chaîne légère de l'anticorps McPC603	Jager & Pluckthun, 1997
CyPA	Dihydrofolase réductase	Von Ahsen <i>et al.</i> , 2000

Par mutagenèse dirigée, Carpentier *et al.* (1999b) ont montré que les résidus R⁶² et F⁶⁷ de la CyPB étaient directement impliqués dans l'activité PPIase. Ils ne sont pas impliqués dans la fixation aux récepteurs membranaires présents sur les lymphocytes T mais sont toutefois nécessaires à l'activité biologique de la CyPB (Carpentier *et al.*, 2002). Cela suggère que l'activité PPIase permettrait l'isomérisation d'une liaison prolyle du récepteur impliqué dans les réponses cellulaires liées à la CyPB. Yurchenko *et al.* (2002) ont d'ailleurs montré par la suite que des mutants de CyPA qui ne possédaient plus d'activité PPIase étaient incapables de générer des signaux intracellulaires. Ils ont également identifié les résidus P¹⁸⁰ et G¹⁸¹ du CD147, récepteur extracellulaire de la CyPA, comme étant indispensables à l'activité chimiotactile et l'activation de voies de signalisation induites par la CyPA.

b. Les FK506-Binding Proteins

Les FKBP constituent la deuxième grande famille des immunophilines. Elles ont été initialement caractérisées par leur capacité à interagir avec des immunosuppresseurs de type macrolide, le FK506 et la rapamycine (Fretz *et al.*, 1991). Comme pour les cyclophilines, les FKBP présentent *in vitro* une activité PPIase mais celle-ci s'observe sur des substrats différents. Les substrats privilégiés des FKBP contiennent en effet un acide aminé hydrophobe précédant le résidu de proline (Harrison & Stein, 1990). La séquence des FKBP est très conservée notamment au niveau des résidus intervenant dans cette activité enzymatique (Kay, 1996). D'autre part, comme pour les cyclophilines, l'activité PPIase est inhibée par leurs immunosuppresseurs. Il n'existe toutefois pas d'homologies structurales entre cyclophilines et FKBP.

Les FKBP se répartissent en deux types : les FKBP à un seul domaine FKBP (FKBP12, 13, 25 et 38) et celles contenant plusieurs domaines FKBP (FKBP51, 52, 54 et 65) (Galat, 2000). La FKBP12, qui est le modèle de base des FKBP, est formée de 5 feuillets β encadrant une courte hélice α (Van Duyne *et al.*, 1993).

Ce sont des protéines ubiquitaires présentes dans la plupart des tissus et à des taux variables. Dans les cellules, elles occupent la majorité des compartiments subcellulaires, sous forme libre ou liée à des complexes récepteurs (Marks, 1996). Une forme extracellulaire de FKBP12 a même été décrite bien que son ARNm ne code pas pour un peptide de sécrétion. Comme pour les cyclophilines A et B, la FKBP 12 pourrait être sécrétée en réponse à des stimuli inflammatoires (Bang *et al.*, 1995 ; Shirakata *et al.*, 1995).

c. Les parvulines

La première parvuline a été identifiée chez *Escherichia coli*. C'est une protéine de masse moléculaire égale à 10,1 kDa, qui ne présente aucune homologie structurale avec les cyclophilines et les FKBP (Rahfeld *et al.*, 1994 ; Rahfeld *et al.*, 1996 ; Scholz *et al.*, 1997). L'activité enzymatique de la parvuline est comparable à celles des cyclophilines mais elle n'est inhibée ni par la CsA, ni par le FK506 (Fischer, 1996). Chez l'Homme, des protéines homologues à la parvuline de *E. coli* ont également été isolées. Par exemple, les gènes *pin1* et *pin1L* codent des parvulines nucléaires qui présentent 90% d'homologie de séquence. Pin1 est composée de deux domaines : un domaine WW N-terminal qui interagit avec des motifs phospho-Ser/Thr-Pro et un domaine PPIase C-terminal. Elle intervient dans l'isomérisation de liaisons phospho-Ser/Thr-Pro et régule la fonction de phosphoprotéines mitotiques (Lu *et al.*, 1996 ; Lu *et al.*, 1999).

d. Le Trigger factor

La quatrième famille de PPIase n'est représentée que par un seul membre, le *Trigger factor*, également isolé chez *E. coli* (Stoller *et al.*, 1995). Sa masse moléculaire est de 48 kDa. Le *Trigger factor* est colocalisé avec les chaînes naissantes de la sous-unité 50 S du ribosome, suggérant une implication dans la mise en conformation des protéines en cours de synthèse (Valent *et al.*, 1995 ; Hestekamp *et al.*, 1996).

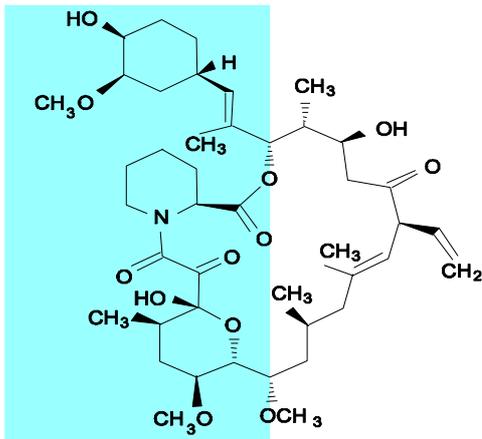
C - IMMUNOSUPPRESSION

1. Généralités

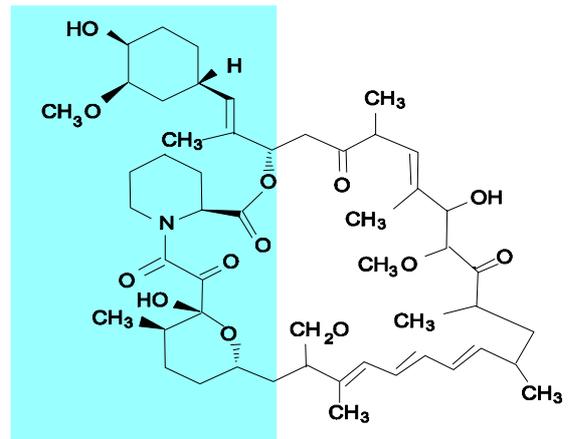
a. Le complexe cyclophiline/cyclosporine A

La CsA est un undécapeptide cyclique hydrophobe produit par le champignon *Tolyocladium inflatum* (MM = 1203 Da) (Figure 4). La CsA montre une activité immunosuppressive très importante, ce qui fait d'elle le médicament le plus utilisé dans la prévention des rejets de greffe. Au moins 25 composés naturels de la cyclosporine ont été dénombrés, mais seule la CsA est utilisée pour ses propriétés immunosuppressives. Elle est également indiquée dans le traitement de maladies auto-immunes comme le diabète insulino-dépendant, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et les uvéites (Borel *et al.*, 1976).

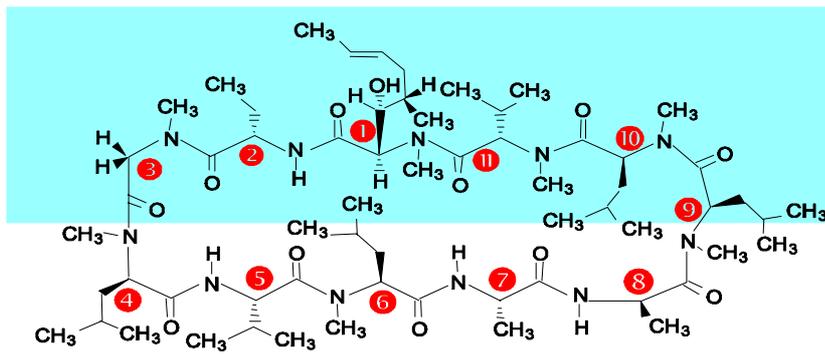
Les cyclophilines sont capables de fixer spécifiquement et réversiblement une molécule de CsA. Les constantes de dissociation de la CsA pour les différentes cyclophilines sont comprises entre 10^{-8} et 10^{-9} M (Liu *et al.*, 1990 ; Husi & Zurini, 1994).



FK506



Rapamycin



Cyclosporine A

Figure 4 : Structure des immunosuppresseurs avec leurs domaines de liaison aux immunophilines (bleuté).

Contrairement aux autres protéines de type tonneau β qui fixent leurs ligands hydrophobes à l'intérieur du cylindre formé par les feuilletts β , la CsA se fixe à la surface du tonneau β des cyclophilines dans une poche hydrophobe (Figure 5) (Hsu *et al.*, 1990).

L'efficacité thérapeutique de la CsA peut varier en fonction du type de transplantation et de son ancienneté. Des doses faibles font encourir un risque de rejet alors que des doses élevées font craindre des manifestations de toxicité (Lindholm, 1991a). La CsA diffuse passivement dans toutes les cellules du sang. Seuls 5% du médicament sont réellement incorporés dans les lymphocytes, le reste étant majoritairement associé aux hématies (Lindholm, 1991b). Si cette fraction est négligeable en regard de celle présente dans les érythrocytes, elle est déterminante puisque seule cette fraction est responsable de l'activité immunosuppressive (Lindholm, 1991b ; Barre, 1992). L'utilisation clinique de la CsA est également caractérisée par une grande variabilité intra- et inter-individuelle. Une hétérogénéité de la réponse lymphocytaire à l'effet immunosuppresseur de la CsA a été constatée lors du traitement des transplantés et rapportée dans des études *in vitro* (Sander *et al.*, 1986 ; Povlsen *et al.*, 1990 ; Masy *et al.*, 1994). Toutefois en présence de CyPB, tous les individus acquièrent un phénotype de répondeur sensible au médicament, suggérant que la CyPB plasmatique diminue les phénomènes de résistance lymphocytaire au médicament (Denys *et al.*, 1997 ; Denys *et al.*, 1998a).

b. Le complexe cyclophiline-sanglifehrine

La recherche de substances capables de se fixer aux cyclophilines dans des extraits microbiens a conduit à l'isolement chez *Streptomyces sp.* A92-308110 d'une nouvelle classe de macrolides appelés sanglifehrines (Sanglier *et al.*, 1999 ; Sedrani *et al.*, 2003). Sur les 20 sanglifehrines isolées, la sanglifehrine A (SFA) est la plus abondante. Son affinité pour les cyclophilines est environ 60 fois plus élevée que celle de la CsA (Zenke *et al.*, 2001). La SFA possède également une activité immunosuppressive. Il semble toutefois que le mode d'action soit différent de ce qui est connu pour la CsA, le FK506 et la rapamycine (Zhang & Liu, 2001 ; Zhang *et al.*, 2001).

c. Les complexes FKBP/FK506 et FKBP/rapamycine

Le FK506 et la rapamycine sont des macrolides immunosuppresseurs ayant un site commun de reconnaissance pour les FKBP (Figure 4).

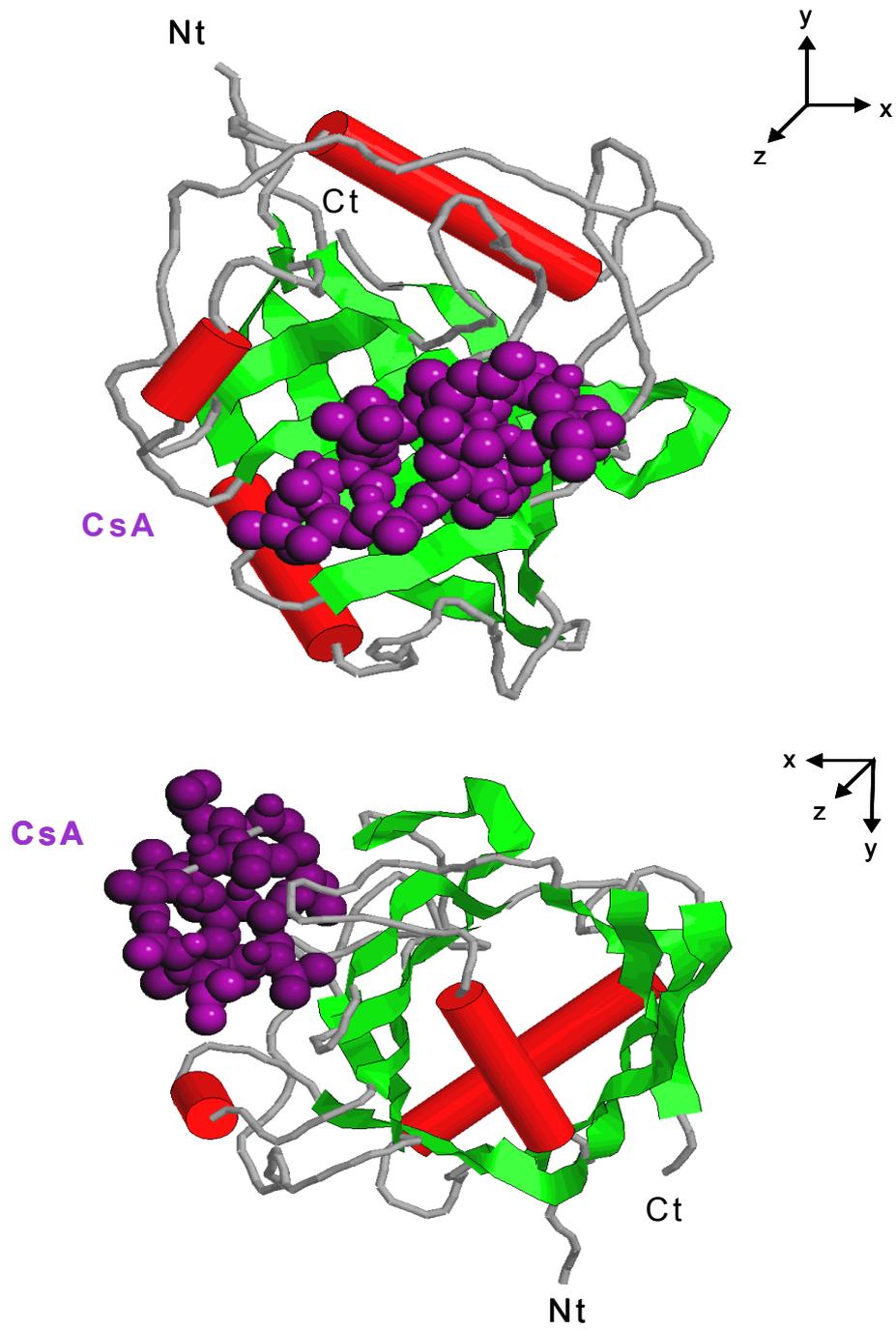


Figure 5 : Conformation tridimensionnelle du complexe CyPA/CsA (1CWA)

Le FK506 a été isolé à partir de culture de *Streptomyces tsukubaiensis* (Stütz, 1992) alors que la rapamycine fut originellement définie comme un antifongique produit par *Streptomyces hygroscopicus* (Sehgal *et al.*, 1975). Bien que sa structure diffère de celle de la CsA, les propriétés immunosuppressives *in vitro* du FK506 sont similaires. En revanche, l'activité immunosuppressive de la rapamycine diffère totalement de celle des deux autres composés. CsA, FK506 et rapamycine sont utilisés cliniquement dans des thérapies immunosuppressives pour traiter et prévenir les rejets de greffe (Blankenship *et al.*, 2003). Toutefois, la CsA reste à ce jour le traitement de choix. L'utilisation clinique de la rapamycine a été autorisée aux Etats-Unis dans des cas de greffe de rein (Danovitch, 1999), et son utilisation clinique a récemment été élargie (Blankenship *et al.*, 2003). Les propriétés antiprolifératives de la rapamycine et le fait qu'elle ne cause pas de néphrotoxicité fait de cet immunosuppresseur une alternative à l'utilisation de la CsA et pourrait faire d'elle un candidat idéal pour traiter les dysfonctions chroniques liées aux allogreffes (Formica *et al.*, 2003 ; Kuypers *et al.*, 2003 ; Stepkowski, 2003).

2. Mécanisme de l'immunosuppression

La fixation des immunosuppresseurs aux immunophilines inhibe l'activité PPIase (Fisher *et al.*, 1989 ; Harding *et al.*, 1989 ; Siekierka *et al.*, 1989 ; Galat *et al.*, 1992 ; Peattie *et al.*, 1992), indiquant que le site de fixation des immunosuppresseurs et le site catalytique sont confondus. Les médicaments se logent dans le domaine catalytique des immunophilines et miment l'état de transition *cis-trans* de la liaison prolyle. Bien que de structures très différentes, la CsA et le FK506 adoptent en effet une conformation particulière de type β -turn. L'interaction avec le domaine de fixation des PPIases se fait grâce à cette homologie conformationnelle. Etant donné leur capacité à se fixer au site enzymatique des immunophilines, il avait été suggéré que le mode d'action des immunosuppresseurs passait par l'inhibition de cette activité PPIase. Toutefois, il est rapidement apparu qu'étant donné les taux importants d'immunophilines dans les cellules, les faibles doses effectrices de médicaments n'étaient pas suffisantes pour inhiber toutes les PPIases présentes. Par ailleurs, l'activité PPIase peut être inhibée par des ligands non immunosuppresseurs, suggérant l'implication d'une autre molécule cible dans les mécanismes d'immunosuppression (Bierer *et al.*, 1990a).

Ainsi, il est apparu que chaque immunosuppresseur possède deux domaines fonctionnels : un domaine de fixation à l'immunophiline et un domaine effecteur, permettant l'interaction avec un partenaire protéique (Ivery, 2000). Bien que de structures différentes, les

complexes cyclophiline/CsA et FKBP/FK506 inhibent une même protéine, la calcineurine. En revanche, seul le complexe FKBP12/rapamycine interagit avec mTOR, une protéine apparentée à la famille des PI-3 kinases.

a. Effets des complexes CyPA/CsA et FKBP12/FK506

La CsA et le FK506 bloquent l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes de cytokines, telles que l'IL-2, l'IFN γ (*Interferon- γ*), le TNF α (*Tumor Necrosis Factor- α*) (Granelli-Piperno, 1988 ; Tocci *et al.*, 1989 ; Bierer *et al.*, 1990b), la dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques, des mastocytes et des granulocytes (Trenn *et al.*, 1989 ; Cirillo *et al.*, 1990 ; Dutz *et al.*, 1993), l'apoptose induite *in vitro* de cellules T et la sélection des thymocytes *in vivo* (Shi *et al.*, 1989 ; Bierer *et al.*, 1991 ; Fruman *et al.*, 1992). Deux points communs liés à ces différents phénomènes sont l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire et l'activation d'une sérine/thréonine phosphatase Ca²⁺ et calmoduline dépendante, la calcineurine (Bierer *et al.*, 1991). La calcineurine ou protéine phosphatase 2B (PP2B) (Liu *et al.*, 1991 ; Aramburu *et al.*, 2000 ; Rusnak & Mertz, 2000) est une protéine dimérique ubiquitaire qui possède une répartition très hétérogène (Buttini *et al.*, 1995 ; Stemmer *et al.*, 1995). Elle est constituée d'une sous-unité catalytique de 59-61 kDa (CnA) qui contient le site de fixation de la calmoduline et d'une sous-unité régulatrice de 19 kDa (CnB) (Kincaid *et al.*, 1987).

In vitro, les complexes cyclophiline/CsA et FKBP/FK506 peuvent se former, mais *in vivo*, seuls les complexes CyPA/CsA et FKBP12/FK506 interagissent avec la calcineurine (Friedman & Weisman, 1991 ; Liu *et al.*, 1991 ; Swanson *et al.*, 1992 ; Kieffer *et al.*, 1992).

De par leur capacité à interagir avec la calcineurine *via* leur immunophiline associée, la CsA et le FK506 ont une activité immunosuppressive similaire en bloquant la calcineurine, enzyme clé dans l'activation de la transcription de l'interleukine-2 (IL-2), ce qui a pour conséquence de bloquer la prolifération lymphocytaire.

Dans les lymphocytes T, l'un des substrats de la calcineurine est la sous-unité cytosolique du facteur de transcription NF-AT. Une fois déphosphorylé, le NF-AT subit une translocation dans le noyau où il s'associe à d'autres protéines nucléaires, formant ainsi un complexe capable d'induire l'expression de l'IL-2 (Jain *et al.*, 1992 ; Jain *et al.*, 1993 ; McCaffrey *et al.*, 1993). C'est en bloquant la déphosphorylation du NF-AT que les complexes cyclophiline/CsA et FKBP/FK506 exercent leur activité immunosuppressive (Flanagan *et al.*, 1991 ; Kung & Halloran, 2000). Outre la voie du NF-AT, l'activation des MAP kinases est également impliquée dans l'induction de l'expression de l'IL-2. Les complexes

immunophiline/ligand bloquent l'activation des voies p38 et JNK (c-Jun amino-terminal kinase) en agissant en amont des MAP kinases kinases kinases (MAPKK-K) lors de l'activation lymphocytaire, et ceci indépendamment de la calcineurine (Matsuda *et al.*, 2000).

b. Effets du complexe FKBP12/rapamycine

Contrairement à la CsA et au FK506, la rapamycine bloque la prolifération des lymphocytes T en empêchant leur progression dans la phase S du cycle cellulaire (Bierer *et al.*, 1990b ; Dumont *et al.*, 1990). En effet, le complexe FKBP12/rapamycine agit en bloquant une protéine apparentée aux PI-3 kinases, dénommée FRAP (*FKBP12 and rapamycine-associated protein*), ce qui affecterait d'autres molécules de signalisation intracellulaire, telles que la p70 S6 kinase, cdc2 et cdk2 (Abraham, 1998). Il est apparu que FRAP, également appelée RAFT1 (*Rapamycine and FKBP12 Target*) ou encore mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Abraham, 1998), joue un rôle majeur dans l'assemblage du ribosome et la régulation de la traduction des protéines, ce qui explique que la rapamycine est un puissant agent anti-prolifératif.

c. Effet du complexe CyPB/CsA

Alors que la CsA diffuse dans toutes les cellules du sang, il apparaît que son incorporation est favorisée dans les lymphocytes en présence de CyPB (Denys *et al.*, 1997 ; Denys *et al.*, 1998a). En effet, la CyPB complexée au médicament conserve ses propriétés de fixation sur les sites de type II, de nature héparane sulfate, alors qu'elle ne peut plus interagir avec les récepteurs protéiques (Allain *et al.*, 1996 ; Denys *et al.*, 1998b ; Carpentier *et al.*, 1999b). La CyPB liée aux héparanes sulfates n'est pas endocytée, mais le complexe se dissocie probablement à la surface des cellules, permettant à la CsA de pénétrer dans la cellule par simple diffusion au travers de la membrane plasmique. La CyPB plasmatique contribuerait donc à l'efficacité du traitement immunosuppresseur et au maintien de la greffe. A l'inverse, un tel rôle bénéfique n'est pas retrouvé dans le cas de la FKBP12 plasmatique. 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 la concentration plasmatique de cette immunophiline 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.

D – ACTIVITES BIOLOGIQUES DES CYCLOPHILINES

1. Rôle dans la biosynthèse des protéines

Etant donné leur forte conservation au cours de l'évolution, il a été suggéré que les cyclophilines, *via* leur activité PPIase, joueraient un rôle crucial dans la mise en conformation des protéines néosynthétisées. De nombreuses études *in vitro* ont montré que les cyclophilines accélèrent l'isomérisation des liaisons prolyles et catalysent le repliement de diverses protéines (Tableau I). La première preuve de l'implication de l'activité PPIase dans le repliement des protéines *in vivo* est indirecte. Smith *et al.* (1995) ont montré que cette activité était nécessaire à la sécrétion du procollagène I. La CyPB et la Hsp 47 sont associées au procollagène I depuis le réticulum jusqu'à la voie de sécrétion. En présence de CsA, la quantité de CyPB associée au procollagène est diminuée, suggérant que la CsA entre en compétition avec le procollagène pour se fixer à la CyPB. En bloquant ainsi la maturation du procollagène, la CsA inhibe sa sécrétion (Price *et al.*, 1994), mettant donc en évidence un rôle de la CyPB dans la maturation du collagène I.

2. Régulation du canal mitochondrial

Des conditions de stress oxydatif ou des concentrations très élevées en calcium ou phosphate inorganique induisent l'ouverture d'un pore non spécifique de la membrane interne des mitochondries. L'ouverture de ce pore rend la mitochondrie perméable aux petits solutés et se traduit par un gonflement de ce même organite. Ce phénomène, appelé MPT (*Mitochondrial Permeability Transition*) est notamment impliqué dans l'apoptose des cellules (Kroemer *et al.*, 1997 ; Crompton, 1999). Le pore mitochondrial est un complexe multi-protéique comprenant un canal ionique dépendant du voltage situé dans la membrane externe, une adénine nucléotide translocase (ANT) située dans la membrane interne et la CyPD située dans la matrice (Tanveer *et al.*, 1996 ; Crompton, 1999). L'association de la CyPD avec le pore MPT se fait au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Connern & Halestrap, 1994 ; Johnson *et al.*, 1999). Lors d'un stress cellulaire, la CyPD se fixe à l'ANT et maintient le pore dans une conformation ouverte. Ce phénomène est dépendant de l'activité PPIase de la CyPD (Lin & Lechleiter, 2002). En s'associant à la CyPD, la CsA favorise la conformation fermée du pore mitochondrial, protégeant ainsi les cellules du phénomène MPT (Crompton *et al.*, 1988 ; Griffiths & Halestrap, 1991 ; Connern & Halestrap, 1994 ; Nicolli *et al.*, 1996).

3. Régulation de l'activité de la CAML

La *calcium-signal modulating cyclophilin ligand* (CAML) est une glycoprotéine transmembranaire de 296 acides aminés (MM = 44 kDa). Elle contient 3 régions C-terminales hydrophobes transmembranaires, un petit domaine intraluminal et un large domaine cytosolique (Bram & Crabtree, 1994). La CAML est colocalisée avec le Ca^{2+} , l'ATPase II Ca^{2+} dépendante, la calréticuline et la CyPB, dans le réticulum endoplasmique ou le réticulum sarcoplasmique (Holloway & Bram, 1996 ; Holloway & Bram, 1998). Elle n'interagit ni avec la CyPA ou la CyPC ni avec la FKBP12 (Bram & Crabtree, 1994). La CAML est un récepteur spécifique de la CyPB et le complexe formé serait impliqué dans la régulation de l'ouverture de canaux calciques (Holloway & Bram, 1996). En régulant la libération de Ca^{2+} intracellulaire, la CAML régulerait l'activation de la calcineurine et ainsi l'activation transcriptionnelle du gène de l'IL-2 (Bram & Crabtree, 1994).

4. Interactions avec la CyCAP

La *CyPC-associated protein* (CyCAP) est une N-glycoprotéine de 574 acides aminés (MM = 77 kDa) (Friedman & Weissman, 1991). La CyCAP contient un domaine riche en cystéine appelé domaine SRCR (*Scavenger-Receptor Cysteine Rich*) que l'on retrouve dans les régions extracellulaires de plusieurs protéines transmembranaires ou sécrétées. D'autre part, elle possède une séquence signal dans son domaine N-terminal, suggérant que la protéine puisse être sécrétée. La CyCAP est un homologue structural et fonctionnel de la *Mac-2 binding protein*, un facteur impliqué dans les réponses immunitaires et inflammatoires (Trahey & Weissman, 1999 ; Jalkanen *et al.*, 2001). Des souris déficientes en CyCAP deviennent plus sensibles aux endotoxines bactériennes et surexpriment des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et les TNF. Enfin, elle est surexprimée et sécrétée en grande quantité dans les liquides biologiques en réponse à des stimuli inflammatoires (Trahey & Weissman, 1999). L'ensemble de ces données suggère que la CyCAP serait impliquée dans la régulation de phénomènes inflammatoires.

5. Activité nucléasique

In vitro, les cyclophilines A, B et C possèdent une activité nucléasique $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dépendante, distincte de leur activité PPIase et stimulée par la CsA (Montague *et al.*, 1994 ; Montague *et al.*, 1997 ; Wine *et al.*, 1997 ; Nagata *et al.*, 2000). Elles sont capables de dégrader l'ADN simple et double brins et d'induire des terminaisons 3'OH caractéristiques de l'activité des nucléases apoptotiques. La CyPA partage d'ailleurs de fortes homologies de

séquence avec la NUC18, une endonucléase de 18 kDa impliquée dans la dégradation de l'ADN des cellules en apoptose. L'activité de NUC18 est également dépendante des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} mais est inhibée par les ions Zn^{2+} (Gaido & Cidlowski, 1991). Durant le processus d'apoptose, la CyPA perd sa capacité à fixer le Zn^{2+} , ce qui induirait alors son activité nucléasique (Krummrei *et al.*, 1995). Ces données suggèrent que des cyclophilines, et en particulier la CyPA, seraient impliquées, *in vivo*, dans la dégradation de l'ADN génomique durant l'apoptose (Montague & Cidlowski, 1996 ; Montague *et al.*, 1997).

6. Activité mitogène

Caroni *et al.* (1991) ont montré que la CyPB sécrétée d'embryon de Poulet était un facteur de croissance pour les cellules embryonnaires de la moelle épinière, des fibroblastes et des cellules de cœur de Poulet. Plus récemment, Jin *et al.* (2000) ont montré que la CyPA augmente la prolifération de cellules de muscles lisses. Les activités mitogènes des CyPA et CyPB ne sont toutefois pas comparables à celles des facteurs de croissance habituels, suggérant que ces activités mitogènes ne sont qu'une conséquence des effets des cyclophilines sécrétées sur le métabolisme et la survie des cellules. En effet, les CyPA et CyPB sécrétées activent la voie des MAP-kinases ERK1 et ERK2, des protéines connues pour leur implication dans les mécanismes de prolifération et de survie cellulaire (Jin *et al.*, 2000 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002). D'autre part, la CyPA sécrétée protège les cellules contre l'apoptose induite par un stress oxydatif (Doyle *et al.*, 1999 ; Jin *et al.*, 2000).

Récemment, Rycyzyn *et al.* (2000) ont montré que la CyPB stimule l'activité mitogène de la prolactine. La prolactine est une hormone peptidique à activité facteur de croissance dont l'activité est dépendante de la fixation à un récepteur couplé à la voie Jak2/STAT5. En interagissant avec la prolactine, la CyPB induirait un phénomène de rétro-translocation du complexe CyPB/prolactine vers le noyau, où la prolactine agirait comme activateur transcriptionnel. Ce complexe interagirait directement avec STAT5, provoquant l'activation de ce facteur de transcription par dissociation de son répresseur. Il semble donc que l'activité mitogène du complexe soit indépendante de l'activité kinase Jak2 et de la dimérisation de STAT5 (Rycyzyn & Clevenger, 2002). L'activité PPIase de la CyPB est indispensable à ce phénomène puisqu'un mutant de CyPB qui ne possède plus d'activité enzymatique est incapable de stimuler l'effet mitogène de la prolactine même s'il n'empêche pas la rétro-translocation du complexe dans le noyau.

D'autres études réalisées *in vivo* et *in vitro* par la même équipe ont mis en évidence une interaction entre la CyPA et le récepteur de la prolactine (Syed *et al.*, 2003). Ces auteurs ont

montré que la surexpression de la CyPA dans des cellules CHO transfectées par le récepteur prolongeait notamment la phosphorylation de Jak-2.

7. Activité pro-inflammatoire

C'est en recherchant de nouveaux facteurs chimioattractants pour les éosinophiles que Xu *et al.* (1992) ont isolé chez le Rat une protéine de 18 kDa dont la séquence N-terminale est identique à la CyPA. Ils ont également montré *in vitro* que la CyPA recombinante est capable de stimuler la migration des éosinophiles et des neutrophiles obtenus par différenciation des cellules de la lignée pro-myélocytaire HL-60. L'activité est maximale en présence de 10 nM de CyPA. Parallèlement à ces travaux, Sherry *et al.* (1992) ont montré que des macrophages de Souris stimulés par le LPS sécrètent la CyPA. La CyPA possède *in vivo* une activité inflammatoire et *in vitro* une activité chimiotactile pour les monocytes et les neutrophiles du sang. Ces deux équipes ont montré que les activités biologiques de la CyPA sont inhibées par la CsA, suggérant que la région impliquée dans la fixation au récepteur et/ou l'activité PPIase est (sont) indispensable (s) à ce phénomène.

Gonzalez-Cuadrado *et al.* (1996) ont montré que le niveau d'expression de l'ARNm de la CyPB augmente dans les fibroblastes rénaux interstitiels activés, suggérant que la CyPB sécrétée pourrait jouer un rôle actif dans le recrutement des leucocytes dans l'interstitium.

Plus récemment, Yurchenko *et al.* (2001, 2002) ont montré que l'activité chimiotactile des CyPA et CyPB est dépendante de la présence du CD147 et des voies de signalisation associées. Par ailleurs, le site catalytique de la CyPA est indispensable à la génération de signaux intracellulaires associés au CD147, suggérant que l'activité PPIase des cyclophilines est indispensable à leur activité chimioattractante (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002). Le CD147, encore appelé neurothéline, basigine ou EMMPRIN (*Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*), est une glycoprotéine de 40 à 70 kDa. C'est un membre de la superfamille des immunoglobulines exprimé à la surface de nombreux types cellulaires (Gething & Sambrook, 1992 ; Bartz *et al.*, 1995 ; Billich *et al.*, 1995). Il est impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques, tels que l'activation des lymphocytes T (Koch *et al.*, 1999), la régulation des mécanismes d'adhésion et d'agrégation cellulaires (Kasinrerk *et al.*, 1999 ; Cho *et al.*, 2001) ou encore l'induction de métalloprotéinases (MMPs) (Ellis *et al.*, 1989 ; Biswas *et al.*, 1995). Les MMPs participent par ailleurs à la libération de la CyPB présente à la surface des chondrocytes en culture (De Ceuninck *et al.*, 2003). Par conséquent, la CyPB produite par les chondrocytes et retenue par leurs protéoglycannes membranaires,

pourrait, en activant le CD147, agir de façon autocrine sur la production des enzymes responsables de sa libération dans le milieu.

8. Interactions avec le HIV-1

Une autre fonction plus inattendue des cyclophilines est leur implication dans le cycle infectieux du virus HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus type 1*). *In vitro*, les CyPA, CyPB et CyPC forment des complexes stables avec la p55^{Gag} (polyprotéine Gag) et la gp120 (Luban *et al.*, 1993 ; Franke *et al.*, 1994 ; Endrich et Gehring, 1998). En revanche, seule la CyPA est incorporée dans les virions durant l'assemblage du virus grâce à des interactions avec la p55^{Gag} (Franke *et al.*, 1994 ; Thali *et al.*, 1994). La CyPA ne joue aucun rôle dans l'assemblage, la maturation et la stabilité du HIV-1 (Grättinger *et al.*, 1999 ; Wiegers *et al.*, 1999 ; Chiu *et al.*, 2002), ni même dans l'empaquetage des protéines et de l'ARN génomique viral (Braaten *et al.*, 1996b). Cependant, elle serait nécessaire à la réplication du HIV-1 dans les cellules infectées (Billich *et al.*, 1995 ; Bartz *et al.*, 1995 ; Braaten *et al.*, 1996b ; Braaten & Luban, 2001). Par exemple, la CsA et ses analogues non-immunosuppresseurs qui inhibent l'incorporation de la CyPA, induisent la diminution du pouvoir infectieux des virions (Rosenwirth *et al.*, 1994 ; Thali *et al.*, 1994 ; Bartz *et al.*, 1995 ; Mlynar *et al.*, 1997 ; Minder *et al.*, 2002). Toutefois, la CsA ne diminue pas la production d'ADN proviral dans le premier temps de l'infection (Minder *et al.*, 2002).

L'interaction avec la protéine Gag du HIV-1 est spécifique, puisque les protéines équivalentes chez d'autres rétrovirus, tels que HIV-2, SIV ou MoMLV n'interagissent pas avec la CyPA (Luban *et al.*, 1993 ; Thali *et al.*, 1994). Cette interaction fait intervenir le site de fixation de la CsA et le site enzymatique de la CyPA (Braaten *et al.*, 1997 ; Dorfman *et al.*, 1997) ainsi que le domaine antigène capsidique (CA), un produit de clivage de la protéine p55^{Gag} (Colgan *et al.*, 1996). Ce phénomène est indispensable aux étapes précoces du cycle infectieux du rétrovirus, étapes qui interviennent après la fixation au récepteur lymphocytaire CD4 et la fusion membranaire, mais avant l'action de la transcriptase réverse (Braaten *et al.*, 1996b).

Après son incorporation, la CyPA subit également une translocation à la surface du virus et deviendrait alors accessible aux récepteurs présents sur les macrophages (Sherry *et al.*, 1998). Les protéoglycannes à chaînes héparanes sulfates (HSPG) et plus particulièrement les syndécans ont été identifiés comme des co-récepteurs du virus HIV-1 sur ces mêmes cellules (Saphire *et al.*, 2001). Selon ces auteurs, l'interaction avec les HSPG des cellules cibles impliquerait des acides aminés basiques situés dans la région C-terminale de la CyPA

(Saphire *et al.*, 1999). D'autre part, Bobardt *et al.* (2003) ont identifié les syndécans comme des co-récepteurs du HIV-1 *via* l'interaction avec la gp120. Ibrahim *et al.* (1999) ont montré, quant à eux que les héparanes sulfates membranaires étaient nécessaires à l'entrée du virus pour quelques lignées cellulaires mais pas pour les lymphocytes primaires. Ces auteurs ont montré que la digestion enzymatique des héparanes sulfates exprimés à la surface des lymphocytes primaires n'avait pas d'influence sur leur capacité à supporter la réplication du rétrovirus, suggérant que les HSPG ne sont pas utiles pour l'entrée du virus dans ces cellules. De même, Zhang *et al.* (2002) excluent un rôle majeur des protéoglycannes dans l'attachement de la plupart des souches de HIV-1 aux cellules cibles *via* des interactions avec la CyPA ou la gp120.

En recherchant de nouveaux co-récepteurs du virus HIV-1, Pushkarsky *et al.* (2001) ont caractérisé une interaction entre le CD147 et la CyPA incorporée dans l'enveloppe virale. Ce récepteur interviendrait dans la fixation et l'entrée du virus dans ses cellules cibles, confirmant ainsi le rôle fonctionnel de la CyPA dans le cycle infectieux du HIV-1. Cependant, à l'inverse de ce qui est observé pour le chimiotactisme, il semble ici que l'activité PPlase de la CyPA ne soit pas nécessaire à la réplication du virus (Saphire *et al.*, 2002). Ainsi, l'interaction entre le site enzymatique de la CyPA et le domaine CA de la protéine Gag ne servirait qu'à l'incorporation de la CyPA dans les virions et non à une fixation au CD147.

II - INTERACTION ENTRE LA CYPB ET SES SITES DE FIXATION MEMBRANAIRES

A - FIXATION DE LA CYPB A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES

La caractérisation de formes sécrétées de cyclophilines possédant des activités biologiques a conduit les membres de notre Laboratoire à rechercher des sites de fixation de la CyPB à la surface des cellules du sang. En raison de l'implication de ces protéines dans l'activité immunosuppressive de la CsA, les premières études de fixation de la CyPB ont été réalisées sur les lymphocytes T. Dans ce contexte, Allain *et al.* (1994) ont mis en évidence des sites de fixation spécifiques sur les cellules de la lignée lymphoblastique Jurkat ainsi que sur les lymphocytes T du sang.

Denys *et al.* (1998b) ont ensuite montré que coexistaient en fait deux types de site de fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T circulants. Le premier site de fixation, dénommé site de type I, est insensible à la force ionique mais est altéré par la trypsine ou un pH acide, suggérant que ce récepteur est de nature protéique. D'autre part, la fixation de la

CyPB sur son récepteur lymphocytaire induit une internalisation rapide de ce dernier, suggérant que le récepteur de type I est un récepteur protéique fonctionnel. Récemment, le CD147 a été identifié comme étant un récepteur potentiel des CyPA et CyPB (Pushkarsky *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002). En effet, seules les cellules CHO transfectées avec le CD147 sont capables de répondre aux deux cyclophilines. Néanmoins, aucune interaction directe n'a pu être caractérisée avec le CD147. Les auteurs expliquent l'incapacité à mesurer un Kd par une faible affinité et une interaction de nature similaire à celle d'une enzyme pour son substrat (Yurchenko *et al.*, 2002).

Le second site de fixation, dénommé site de type II, est sensible à la force ionique et détruit par l'héparinase I, suggérant que le type II est représenté par des protéoglycannes membranaires portant des motifs héparanes sulfates. Ces sites glycaniques sont spécifiques puisque les deux sites de fixation ont été décrits avec une même affinité ($Kd \approx 10$ nM). Toutefois, les sites de nature glycanique sont environ 3 fois plus représentés que les sites de type I (25000 ± 10000 pour le site de type I *versus* 70000 ± 25000 pour le site de type II) (Denys *et al.*, 1998b).

La répartition des sites de fixation de la CyPB à la surface des différentes sous-populations lymphocytaires a également été étudiée. Denys *et al.* (1997) ont ainsi montré par double marquage en cytofluorimétrie en flux que les sites de fixation sont présents principalement sur les lymphocytes T CD4⁺. Ils sont par ailleurs distribués de façon équivalente sur les lymphocytes naïfs et mémoires. Le nombre de sites de fixation de la CyPB est fortement réduit sur les lymphocytes activés, alors que l'affinité reste constante, ce qui suggère que l'activation induit une régulation négative de leur expression.

Par ailleurs, la cyclophiline B plasmatique a été dosée par Allain *et al.* (1995) qui ont estimé sa concentration plasmatique à 150 ± 80 ng/ml (5 ± 2 nM). Chez les patients qui ont subi une transplantation d'organe, celle-ci est de $13 \pm 6,5$ nM (Denys *et al.*, 1998a). Complexée à la CsA, la CyPB est seulement capable de se fixer aux sites de type II. La CsA peut alors se décomplexer de la CyPB et diffuser à travers la membrane pour s'accumuler dans la cellule où elle s'associe à la CyPA et exerce son activité immunosuppressive (Allain *et al.*, 1996 ; Denys *et al.*, 1998a). La CyPB plasmatique contribuerait donc à augmenter l'efficacité du médicament en favorisant son ciblage vers les cellules T *via* la fixation du complexe CyPB/CsA sur les protéoglycannes membranaires.

B - REGIONS DE LA CYPB IMPLIQUEES DANS LA FIXATION AUX DEUX TYPES DE RECEPTEURS

La CyPB mature est composée d'un noyau central dont la séquence est très proche de celle de la CyPA et de deux extensions N- et C-terminales spécifiques. Des observations préliminaires ont suggéré que le noyau central de la CyPB pouvait être impliqué dans la fixation au site de type I. La CsA abolit en effet la fixation de la CyPB au récepteur protéique (Allain *et al.*, 1996 ; Denys *et al.*, 1998a). En ce qui concerne le site de type II, Mariller *et al.* (1996) ont montré que l'extrémité N-terminale de la CyPB est directement impliquée dans la fixation spécifique au récepteur. Cette région contient la séquence basique ¹DEKKKGPK⁸, proche de certaines séquences consensus décrites comme intervenant dans des interactions entre GAGs sulfatés et protéines de la famille des HBP (*Heparin Binding Proteins*) (Cardin & Weintraub, 1989). Cette séquence spécifique de la CyPB explique pourquoi ni la CyPA, ni la CyPC ne sont capables de se fixer aux sites de type II.

Afin de déterminer plus précisément la nature des acides aminés de la CyPB impliqués dans l'interaction avec chacun des deux types de récepteur, les membres de notre Laboratoire ont réalisés des expériences de fixation avec des protéines modifiées par mutagenèse dirigée. Ils ont ainsi substitué certains acides aminés du noyau central d'une part et de l'extrémité N-terminale d'autre part.

Dans un premier temps, trois mutants ont été testés pour leur capacité à interagir avec le récepteur protéique : un mutant modifié au niveau de la fixation à la CsA (CyPB_{W128A}) et deux mutants modifiés au niveau du site catalytique (CyPB_{R62A} et CyPB_{F67A}). La mutation du résidu W¹²⁸ affecte la fixation au récepteur de type I alors que les mutations R⁶² et F⁶⁷ sont sans effet. Par conséquent, une partie de la poche de fixation de la CsA recouvre le domaine de fixation au récepteur protéique alors que le site enzymatique n'est pas impliqué dans ces interactions. Le résidu W¹²⁸ est commun à toutes les cyclophilines eucaryotes, ce qui laissait penser qu'il pouvait intervenir dans l'interaction de nature hydrophobe avec la CsA. Toutefois, l'affinité de la CyPB pour le site I est plus élevée que celle de la CyPC (isoforme la plus proche de la CyPB), suggérant que des acides aminés spécifiques localisés à proximité de la poche de fixation de la CsA sont également impliqués dans la fixation au site de type I (Carpentier *et al.*, 1999b). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons recherché d'autres acides aminés localisés à proximité du site de fixation de la CsA et susceptibles d'expliquer la spécificité de liaison de la CyPB aux sites de type I. Nous avons ainsi caractérisé cinq résidus, R⁷⁶, G⁷⁷, K¹³², D¹⁵⁵ et D¹⁵⁸, pour lesquels la modification par mutagenèse dirigée réduit

fortement la fixation de la CyPB sur son récepteur protéique. Le résidu K¹³² est commun aux CyPA, CyPB et CyPC et ne peut donc pas expliquer la spécificité de fixation de la CyPB sur son récepteur. Le résidu R⁷⁶ n'est conservé que dans les CyPA et CyPB alors que les trois derniers acides aminés sont communs aux seules CyPB et CyPC. Ces données suggèrent que l'affinité élevée de la CyPB pour son récepteur lymphocytaire est liée à la présence des résidus R⁷⁶, G⁷⁷, K¹³², D¹⁵⁵ et D¹⁵⁸ (Carpentier *et al.*, 2002). Ces cinq résidus sont également impliqués dans la fixation du complexe CyPB/CsA à la calcineurine (Carpentier *et al.*, 2000). L'ensemble de ces travaux indique que la région de la CyPB impliquée dans la fixation aux sites de type I recouvre les sites de liaison à la CsA et à la calcineurine. Bien que ce domaine soit très conservé entre les cyclophilines, des différences mineures de séquence seraient responsables de la spécificité de reconnaissance de la CyPB (Figure 6).

L'utilisation de deux CyPB mutées dans leur extension N-terminale (CyPB_{KKK}- et CyPB_{ΔYFD}) a permis de mettre en évidence le rôle des deux groupements d'acides aminés ³KKK⁵ et ¹⁴YFD¹⁶ dans la fixation aux héparanes sulfates présents à la surface des lymphocytes T. L'implication de la séquence ¹³VYFDLR¹⁸ dans la fixation aux héparanes sulfates a été confirmée par compétition avec des peptides obtenus après hydrolyse ménagée de la CyPB par une endoArgC à coupure secondaire endo-LysC, la clostripaïne.

La méthode protéolytique n'a pas mis en évidence d'autres fragments, suggérant que si d'autres régions sont impliquées, celles-ci seraient uniquement conformationnelles ou contiendraient des résidus R ou K éloignés les uns des autres. Le tripeptide YFD a déjà été décrit comme un motif de fixation du collagène IV sur l'héparine et serait directement impliqué dans l'adhésion cellulaire (Koliakos *et al.*, 1989 ; Wilke & Furcht, 1990). Cette séquence pourrait renforcer l'interaction relative aux interactions ioniques des héparanes sulfates chargés négativement avec les trois lysines ³KKK⁵ de la CyPB (Carpentier *et al.*, 1999b). Les mutants modifiés dans d'autres régions de la CyPB se fixent normalement aux GAGs, confirmant que le peptide N-terminal est seul impliqué dans les interactions avec le site de type II. La CyPA qui ne possède pas cette extension N-terminale est toutefois capable de se fixer aux héparanes sulfates membranaires (Saphire *et al.*, 1999). Ces auteurs ont identifié une région basique, ¹⁴⁸RNGKTSKK¹⁵⁵, localisée dans l'extrémité C-terminale de la protéine, impliquée spécifiquement dans ces interactions. Toutefois, il semble que l'absence d'extension N-terminale explique pourquoi la CyPA est éluée à faible force ionique d'une colonne d'héparine immobilisée (0,15 M contre 0,6 M en NaCl pour la CyPB) et pourquoi la CyPA n'entre pas en compétition avec la CyPB fixée sur l'héparine ou sur les sites glycaniques des lymphocytes T (Denys *et al.*, 1998b ; Saphire *et al.*, 1999).

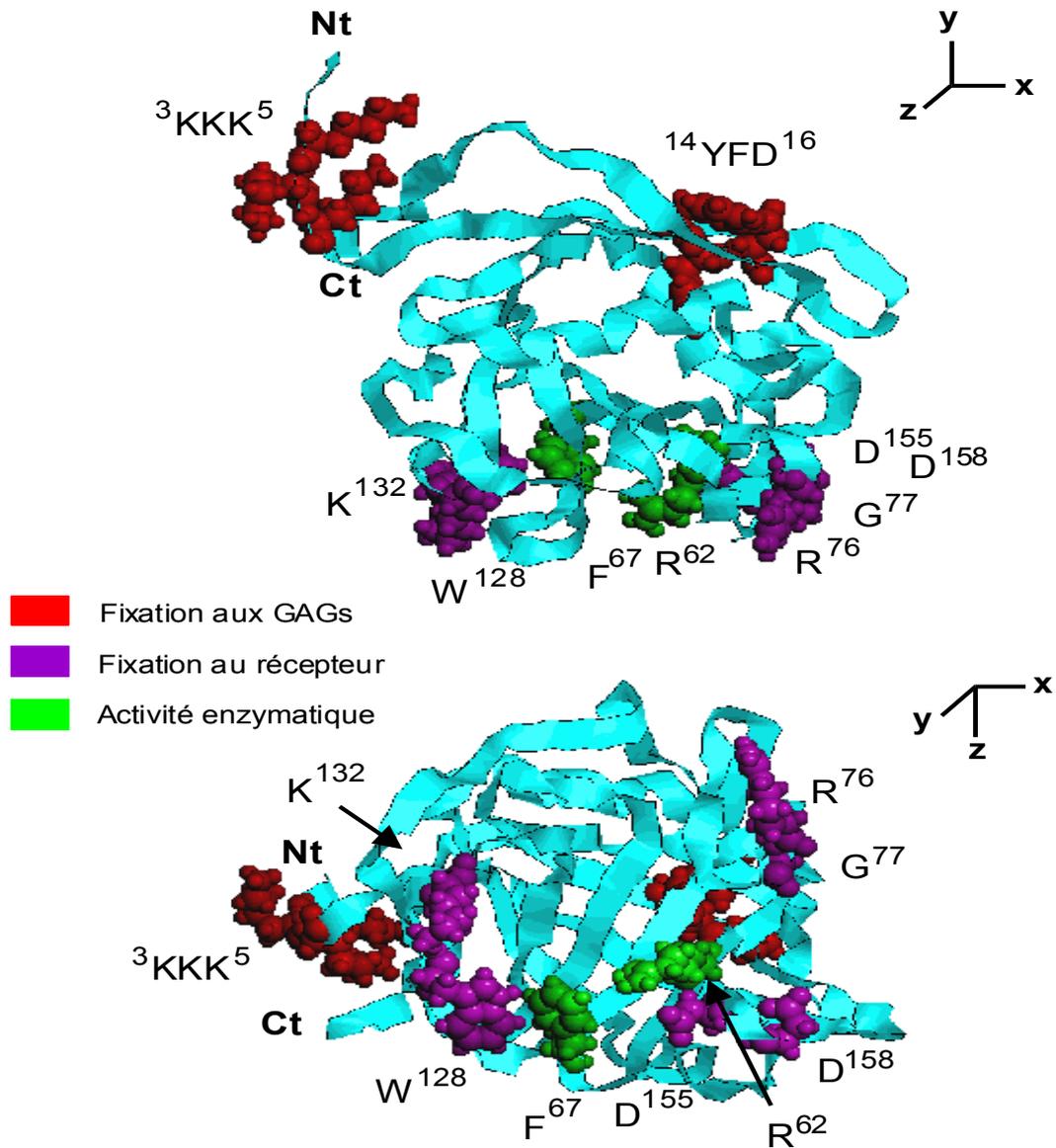


Figure 6 : Identification des régions de la CyPB impliquées dans l'activité enzymatique et dans la fixation aux GAGs et au récepteur protéique. Les représentations tridimensionnelles de la CyPB sont basées sur le fichier pdb 1CYN. Les coordonnées manquantes de l'extrémité N-terminale $^1\text{DEKKK}^5$ ont été calculées par modélisation moléculaire à l'aide du programme SYBYL.

En modélisant les deux régions distinctes de la CyPB impliquées dans la fixation aux deux sites, Carpentier *et al.* (1999b) ont suggéré que la CyPB était capable d'interagir simultanément avec ses deux types de site puisque situés de part et d'autre de la molécule (Figure 6).

C - LA CYPB : NOUVEAU MEMBRE DES HBP

La CyPB comme toutes les HBPs est capable de se fixer à un récepteur fonctionnel et à des protéoglycannes de type héparane sulfate. Cette famille regroupe des protéines aussi diverses que des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines ou encore d'autres protéines, telles que l'antithrombine III (Capila & Linhardt, 2002).

Une caractéristique commune des HBPs est leur capacité à se fixer simultanément sur les GAGs et sur leur récepteur protéique. Ainsi, en se fixant sur les GAGs sulfatés de l'endothélium, les cytokines et les chimiokines sont préservées du flux sanguin et peuvent encore interagir avec leurs cellules cibles (Tanaka *et al.*, 1993a ; Najjam *et al.*, 1997). Les cellules circulantes remonteraient ainsi vers le site de l'inflammation en suivant un gradient solide de facteurs chimioattractants présents sur l'endothélium et dans la matrice extracellulaire (Tanaka *et al.*, 1993a ; Gilat *et al.*, 1994).

Dans certains cas, les GAGs modulent l'affinité de certains facteurs de croissance et chimiokines pour leur récepteur, induisant en même temps des réponses cellulaires persistantes (Webb *et al.*, 1993 ; Graham *et al.*, 1996). Par exemple, les interactions entre le FGF-2 et les héparanes sulfates favorisent la persistance de signaux intracellulaires indispensables à l'activité mitogène de ce facteur (Uhlrich *et al.*, 1986 ; Yayon *et al.*, 1991 ; Delehedde *et al.*, 2000).

Les interactions HBP/héparane sulfate possèdent un caractère spécifique. Cette association doit en effet être stable dans des conditions de pH et de force ionique physiologiques. Cardin & Weintraub (1989) ont suggéré l'existence de séquence consensus sur les HBPs car certaines d'entre elles possèdent des séquences similaires impliquées dans la reconnaissance des chaînes héparanes sulfates. Toutefois, ces séquences consensus ne sont pas retrouvées pour toutes les HBPs, suggérant que l'association ne repose pas seulement sur des interactions ioniques entre des héparanes sulfates chargés négativement et des régions basiques de la protéine. La spécificité doit s'expliquer par une conformation particulière ou par la présence de séquences clés qui verrouilleraient l'interaction entre la protéine et le motif héparinique.

CHAPITRE II

Les protéoglycannes

I – STRUCTURE DES PROTEOGLYCANNES

Les protéoglycannes appartiennent à la famille des glycoprotéines. Ils sont constitués d'une partie protéique, appelée core protéique sur laquelle sont greffées de façon covalente des chaînes polyosidiques appelées glycosaminoglycannes (GAGs). Ils sont présents à l'intérieur des cellules, à la surface de la plupart des types cellulaires de mammifère et dans la matrice extracellulaire (Delehedde *et al.*, 2002a).

A – LES GLYCOSAMINOGLYCANNES

Les GAGs sont des polysaccharides linéaires constitués de la répétition d'unités disaccharidiques. Ces unités se composent d'une hexosamine, glucosamine (GlcN) ou galactosamine (GalN), substituée ou non par un groupement acétyl ou sulfate sur la fonction amine et d'un acide uronique, acide glucuronique (GlcA) ou iduronique (IdoA). Par ailleurs, les fonctions hydroxyles en position 2 des acides uroniques et en position 3 et/ou 6 des hexosamines peuvent être sulfatées (Silbert *et al.*, 1997). Les GAGs sont donc des molécules fortement chargées négativement, ce qui constitue une différence principale entre les protéoglycannes et les autres glycoprotéines. Les chaînes des GAGs sont constituées de 15 à plusieurs centaines d'unités disaccharidiques, voire plusieurs milliers dans le cas de l'acide hyaluronique.

1. Les familles de glycosaminoglycannes

Quatre types de GAGs ont été décrits (Figure 7).

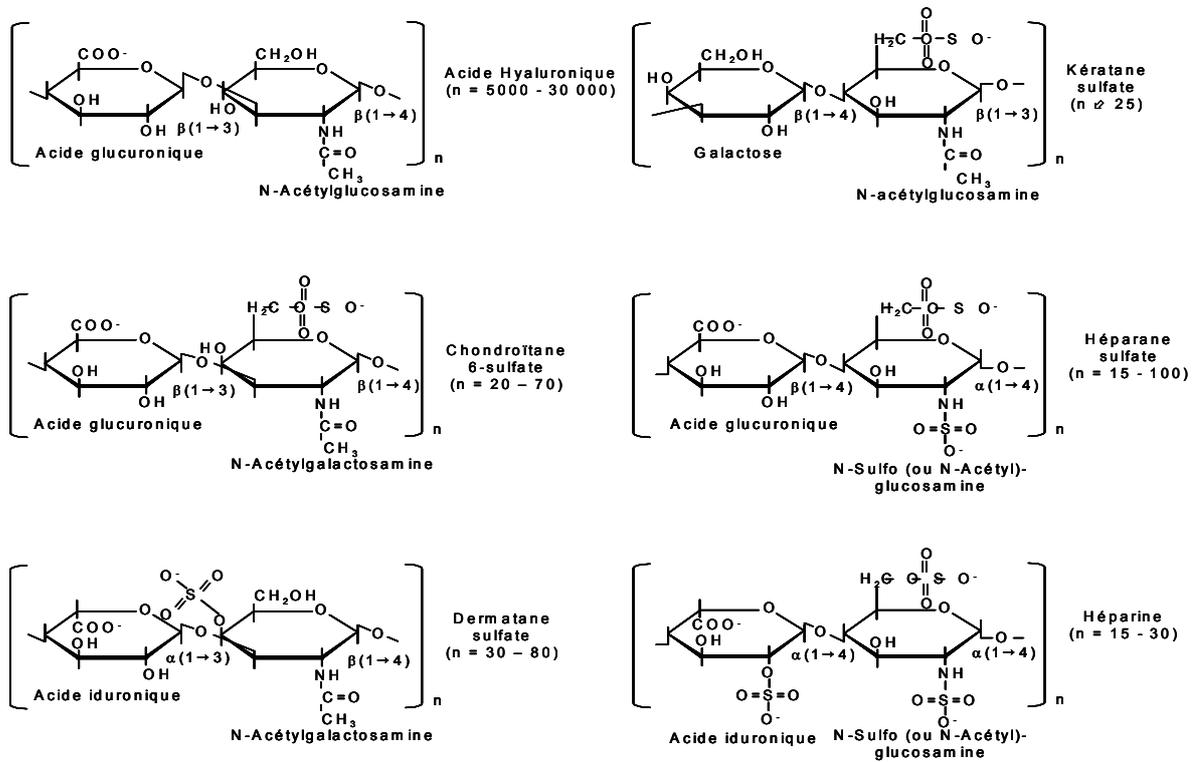
a. L'acide hyaluronique

C'est le plus simple des GAGs. Il est formé de la répétition du motif disaccharidique suivant : [D-acide glucuronique β -1,3-N-acétyl-D-glucosamine]. Les unités disaccharidiques sont liées en β -1,4. A la différence des autres GAGs, l'acide hyaluronique n'est ni sulfaté, ni lié de façon covalente à une protéine (Fraser *et al.*, 1997 ; Weigel *et al.*, 1997).

b. L'héparine et les héparanes sulfates

Ils sont constitués de la répétition d'unités disaccharidiques formées d'acide uronique (acide α -L-iduronique ou β -D-glucuronique) α -1,4-D-glucosamine liées en β -1,4- (ou α -1,4- si l'acide uronique est l'acide iduronique). L'héparine et les héparanes sulfates sont synthétisés à partir d'un précurseur non sulfaté constitué d'unités renfermant un acide glucuronique et une N-acétylglucosamine (Lindahl *et al.*, 1998 ; Casu & Lindahl, 2001 ; Esko & Lindahl, 2001 ; Esko & Selleck, 2002 ; Rabenstein, 2002).

A



B

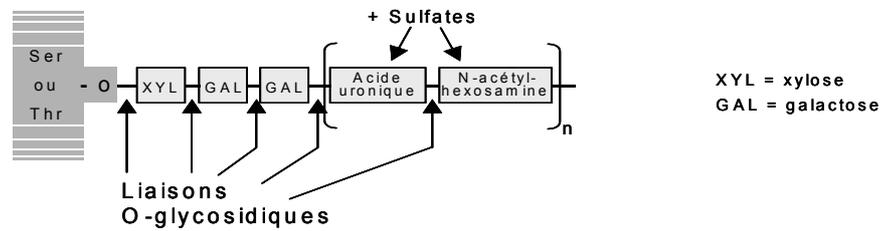


Figure 7 : Organisation des GAGs (A) et du lien entre la protéine et les GAGs (B)

Ce précurseur subit ensuite une série de modifications qui commence par une N-déacétylation/N-sulfatation des résidus de N-acétylglucosamine, une épimérisation des acides glucuroniques en acides iduroniques et des sulfatations variables sur la fonction hydroxyle en position 2 de l'acide iduronique et sur les fonctions hydroxyles en 6 voire 3 des glucosamines.

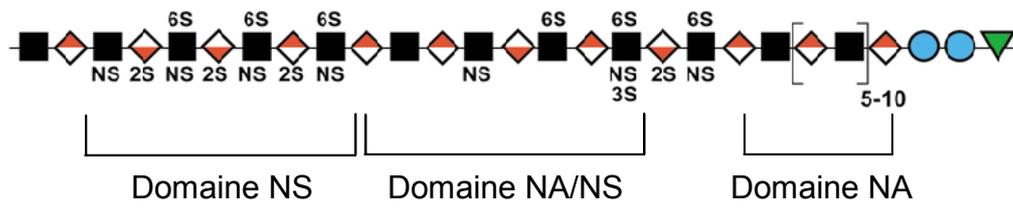
L'héparine est plus fortement sulfatée que les héparanes sulfates (Lyon & Gallagher, 1998). Elle est constituée d'unités disaccharidiques très sulfatées telles que : IdoA2S-GlcNS6S. Le pourcentage et la localisation des sulfatations et des acides iduroniques sont plus variables pour les héparanes sulfates. Ces derniers sont constitués de domaines très sulfatés (domaines NS) alternant avec des domaines faiblement sulfatés qui correspondent en fait à des régions non modifiées (domaines NA) ou des domaines renfermant des unités disaccharidiques N-acétylées et N-sulfatées (domaines NA/NS) (Maccarana *et al.*, 1996 ; Gallagher, 2001) (Figure 8). Les groupements O-sulfatés et les résidus d'acide iduronique sont présents dans les domaines NS et NA/NS mais sont absents des domaines NA. D'autre part, la distribution, la longueur et le niveau de modifications des héparanes sulfates varient considérablement selon les espèces, le tissu, le stade de développement ou les conditions physiopathologiques (Maccarana *et al.*, 1996 ; Lindahl & Lindahl, 1997 ; Brickman *et al.*, 1998 ; Feyzi *et al.*, 1998 ; Esko & Lindahl, 2001 ; Turnbull *et al.*, 2001 ; Esko & Selleck, 2002).

c. Les kératanes sulfates

Ils se distinguent des autres GAGs par la substitution de l'acide uronique par le galactose dans leur motif disaccharidique de base. Ce sont des polymères de [galactose β -1,4- N-acétyl-D-glucosamine] liés en β -1,3-. Le degré de sulfatation varie tout au long des chaînes kératanes. La première, voire les deux premières unités disaccharidiques situées en position réductrice ne sont pas sulfatées. Les unités disaccharidiques suivantes sont monosulfatées voire disulfatées en bout de chaîne (Stuhlsatz *et al.*, 1989 ; Greiling, 1994). Par ailleurs, les chaînes de kératane sulfate ne sont pas forcément linéaires. Elles peuvent contenir des résidus de fucose et se terminer par des acides sialiques (Funderburgh, 2000).

d. Les chondroïtanes sulfates

Ils consistent en l'alternance d'unités disaccharidiques : [acide glucuronique β -1,4-N-acétylgalactosamine] liées en β -1,3-. Selon l'espèce et le tissu étudié, les chondroïtanes sulfates montrent une large gamme de sulfatation. En général, sur une même chaîne de chondroïtane sulfate, les résidus de N-acétylgalactosamine sont majoritairement voire entièrement sulfatés en position 4 ou 6. On parle ainsi de chondroïtane-4 sulfates et de chondroïtane-6 sulfates.



▲ = Xyl
 ● = Gal
 ◊ = GlcA
 ■ = GlcNAc
 ◊ = IdoA

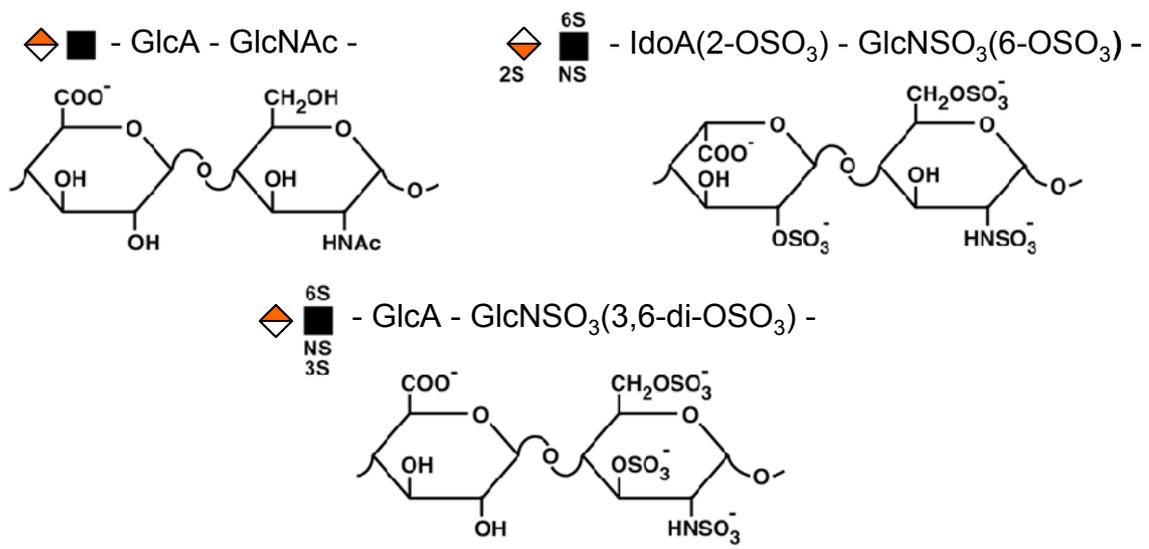


Figure 8 : Domaines structuraux (NA, NA/NS, NS) des chaînes héparanes sulfates (Gallagher, 2001)

Toutefois, les résidus doublement sulfatés en 4 et 6 existent également. L'acide glucuronique sulfaté en position 2 peut être présent à côté d'une N-acétylgalactosamine sulfatée ou non (Silbert *et al.*, 1997).

e. Les dermatanes sulfates

Ils sont plus complexes que les chondroïtanes sulfates. Ils ont le même polymère précurseur, mais la présence d'un acide iduronique suffit à définir le GAG comme un dermatane sulfate plutôt qu'un chondroïtane (Sugahara & Kitagawa, 2000). La présence d'une uronosyl épimérase suffit donc à convertir un chondroïtane sulfate en dermatane. Les résidus d'acide iduronique sont ordinairement présents à côté des N-acétylgalactosamines 4-sulfatées. Par ailleurs, les dermatanes sulfates ont des acides iduroniques très fréquemment sulfatés en position 2 (Silbert *et al.*, 1997).

2. Biosynthèse des chaînes glycosaminoglycannes

La biosynthèse de la chaîne GAG se déroule essentiellement dans l'appareil de Golgi (Silbert & Freilich, 1980 ; Sugumaran & Silbert, 1991). Elle implique l'action ordonnée et concertée d'un grand nombre d'enzymes telles que des glycosyltransférases, épimérases et sulfotransférases (Silbert *et al.*, 1997). La biosynthèse des chaînes héparanes sulfates est la plus détaillée dans la littérature.

La première étape dans la voie de biosynthèse est l'attachement au core protéique de la séquence saccharidique : β -GlcA(1-3)- β -Gal(1-3)- β -Gal-(1-4)- β -Xyl-1-Ser/Thr (Figure 7). Le xylose est lié de façon covalente au groupement hydroxyl d'un résidu de sérine ou de thréonine de la protéine (Gallagher & Lyon, 2000 ; Sugahara & Kitagawa, 2000 ; Esko & Lindahl, 2001). Le premier sucre de la chaîne GAG est toujours l'acide glucuronique, mais celui-ci est considéré comme appartenant au lien tétrasaccharidique parce que son addition est catalysée par une enzyme différente de celle qui catalyse son ajout au sein de la chaîne (Helting & Roden, 1969). Le xylose peut être phosphorylé (Oegema *et al.*, 1984) et un seul ou les deux résidus de galactose peuvent être sulfatés (Sugahara *et al.*, 1992). Des unités disaccharidiques constituées d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine sont ensuite polymérisées de façon séquentielle sur ce tétrasaccharide pour aboutir ainsi à la formation d'un polymère linéaire N-acétylé (Esko & Lindahl, 2001).

Ce polymère [acide glucuronique β -1-4-N-acétylglucosamine] est ensuite modifié par une série de réactions enzymatiques, initiée par une N-déacétylase/N-sulfotransférase qui agit sur les résidus de N-acétylglucosamine (Gallagher & Lyon, 2000 ; Habuchi, 2000 ; Pikas *et al.*, 2000 ;

Ringvall *et al.*, 2000). Chez les vertébrés, quatre isoformes de N-déacétylase/N-sulfotransférase ont été décrites (Esko & Selleck, 2002). Les glucosamines se retrouvent N-sulfatées, ce qui constitue un signal pour l'action des autres enzymes de biosynthèse.

La 5'-glucuronosyl épimérase catalyse l'épimérisation de certains acides D-glucuroniques en acides L-iduroniques. Elle agit sur des acides glucuroniques non sulfatés et situés côté extrémité réductrice de résidus de glucosamines N-sulfatées (Jacobsson *et al.*, 1984 ; Hagner-McWhirter *et al.*, 2000). L'acide L-iduronique peut adopter plusieurs conformations pyranosiques (1C_4 , 4C_1 et 2S_0 contre une seule pour l'acide glucuronique : 1C_4) (Mulloy & Forster, 2000) (Figure 9).

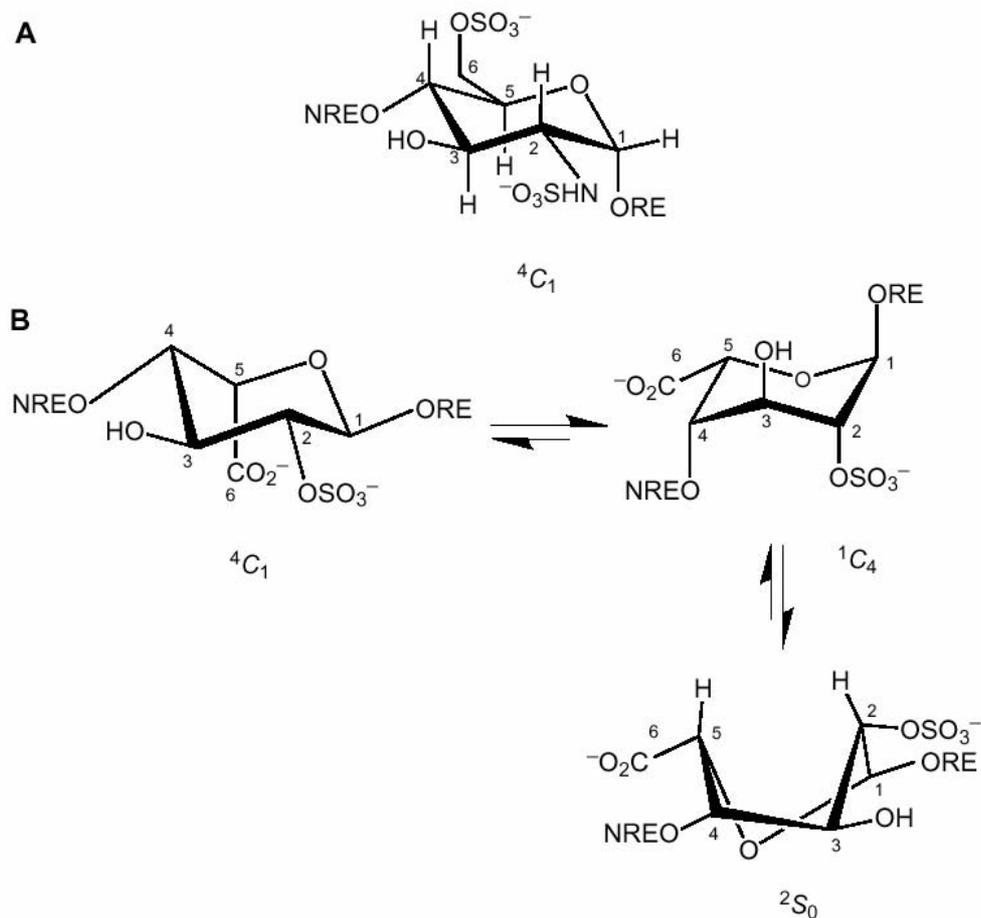


Figure 9 : Flexibilité conformationnelle des résidus de glucosamines (A) et d'acides iduroniques (B) de l'héparine (Capila & Linhardt, 2002)

Ces différentes conformations confèrent une certaine flexibilité aux acides iduroniques. La position en conformation chaise ou bateau des acides iduroniques dépend de leur sulfatation en 2, de la sulfatation des glucosamines adjacentes mais également de la nature protéique du ligand qui se fixe sur la partie oligosidique contenant l'acide iduronique (Esko & Selleck, 2002). L'uronosyl-2-O-sulfotransférase agit à la fois sur les acides glucuroniques et iduroniques. Une seule isoforme est connue chez les vertébrés (Bai *et al.*, 1999). Dans certaines circonstances, la 2-O-sulfatation affecte le degré de N-déacétylation/N-sulfatation des glucosamines N-acétylées et de 6-O-sulfatation (Bai & Esko, 1996 ; Merry *et al.*, 2001), suggérant que la N-déacétylation/N-sulfatation, l'épimérisation et la 2-O-sulfatation ont probablement lieu en même temps (Esko & Selleck, 2002).

Trois glucosaminyl 6-O-sulfotransférases ont été identifiées chez les vertébrés, mais peu de choses sont connues sur leur substrat de préférence. De façon générale, la 6-O-sulfatation est plutôt observée sur des glucosamines N-acétylées ou N-sulfatées voisines d'une glucosamine N-sulfatée (Habuchi *et al.*, 2000).

Actuellement, six glucosaminyl 3-O-sulfotransférases ont été identifiées et clonées (Shworak *et al.*, 1997 ; Shworak *et al.*, 1999 ; Xia *et al.*, 2002). La 3-O-sulfatation des résidus de glucosamine est une modification importante durant la biosynthèse des héparanes sulfates pour au moins deux sites de fixation, celui de l'antithrombine III et celui de la glycoprotéine gD de l'*Herpes simplex virus* (HSV) (Kusche *et al.*, 1988 ; Kusche *et al.*, 1991 ; Shworak *et al.*, 1997 ; Shukla *et al.*, 1999 ; Xia *et al.*, 2002). Les glucosaminyl 3-O-sulfotransférases montrent des similitudes avec les N-déacétylase/N-sulfotransférases, surtout dans le domaine sulfotransférase C-terminal (environ 50%). En revanche, elles n'ont aucune homologie de séquence avec les glucosaminyl 6-O-sulfotransférases, sauf au niveau de petits domaines impliqués dans la fixation du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) (Shworak *et al.*, 1999 ; Habuchi *et al.*, 2000). Ceci n'est pas étonnant puisque toutes les enzymes impliquées dans le transfert de sulfates utilisent le PAPS comme donneur de sulfate.

Certaines glucosamines des chaînes héparanes sulfates semblent échapper au processus de sulfatation au cours de la biosynthèse. Le pourcentage de fonction amine libre varie de 0,7 à 4 % selon l'origine des chaînes héparanes sulfates (Nogard-Sumnicht & Varki, 1995 ; van den Born *et al.*, 1995 ; Toida *et al.*, 1997 ; Westling & Lindahl, 2002). Trois études ont localisé les glucosamines libres à l'interface des domaines N-acétylés et des domaines N-sulfatés (Toida *et al.*, 1997 ; Ding *et al.*, 2001a ; Westling & Lindahl, 2002). Une glucosamine libre reconnue par un anticorps monoclonal (10E4) a d'ailleurs été identifiée dans une région oligosaccharidique non sulfatée (Leteux *et al.*, 2001). De plus, Ding *et al.* (1997) ont émis l'hypothèse que les

résidus de glucosamine libre étaient majoritairement situés au niveau du lien entre le core protéique et les GAGs. En revanche, l'unité disaccharidique IdoA2S-GlcNH₂, séquence identifiée comme cible de la 3-O-sulfotransférase 3A serait située dans des régions très sulfatées (Maccarana *et al.*, 1996 ; Liu *et al.*, 1999 Liu *et al.*, 2002).

Le mécanisme de formation des résidus de glucosamine libre durant la biosynthèse des chaînes héparanes sulfates n'est pas encore bien défini. Plusieurs possibilités sont envisageables. (i) Quelques résidus de glucosamines N-acétylées initialement présents dans le précurseur pourraient échapper au processus de N-déacétylation/N-sulfatation. Les groupements acétyls résiduels pourraient être alors sélectivement enlevés lors d'une étape ultérieure, voire même lorsque tout le processus de biosynthèse est terminé. (ii) Par ailleurs, sur les quatre N-déacétylase/N-sulfotransférases décrites, la NDST-3 a une activité de N-déacétylation beaucoup plus élevée que son activité N-sulfotransférasique (Aikawa *et al.*, 2001), suggérant que cette enzyme pourrait être à la base de la formation des résidus de glucosamine libre. Toutefois, le niveau d'expression de cette enzyme est particulièrement restreint et le pourcentage de glucosamine libre n'augmente pas dans des cellules CHO déficientes en N-sulfatation (Bame *et al.*, 1991). (iii) Enfin, les groupements N-sulfates pourraient être sélectivement éliminés par une endo-sulfamidase durant ou après les étapes de modification.

L'ensemble de ces modifications génère un grand nombre de structures différentes à l'intérieur même des chaînes héparanes sulfates. Par exemple, il existe 15 unités disaccharidiques possibles pour les chaînes héparanes sulfates et au moins 10¹⁶ chaînes différentes de 100 unités disaccharidiques (Delehedde *et al.*, 2001). Par ailleurs, la conséquence du regroupement des N- et O-sulfatations est la formation d'une chaîne polysaccharidique composée de domaines faiblement sulfatés séparés par des domaines NS, qui sont enrichis en groupements sulfates et en acides iduroniques (Lyon & Gallagher, 1998 ; Gallagher, 2001).

La variabilité structurale du polymère d'héparine/d'héparane sulfate est donc le résultat de modifications incomplètes par différentes enzymes de biosynthèse. Le rôle de facteurs supplémentaires comme éléments régulateurs pour ces enzymes dans la voie de biosynthèse n'a pas encore été déterminé (Capila & Linhardt, 2002).

B – LES CORES PROTEIQUES

En raison de leur forte hétérogénéité, il est difficile d'établir une classification des protéoglycannes. Il est toutefois possible de les classer selon leur localisation cellulaire (Silbert

et al., 1997 ; Delehedde *et al.*, 2002a). On distingue ainsi les protéoglycannes intracellulaires, membranaires et ceux de la matrice extracellulaire (Tableau II).

Tableau II : Classification des principaux types de protéoglycannes
(Silbert *et al.*, 1997)

Localisation	Type	HSPG	Chaînes GAGs
Matrice extracellulaire	Protéoglycannes de remplissage	Aggrécan, versican	CS,KS
	PG associés au collagène	Décorine, biglycan	DS
		Fibromoduline, lumican	KS
	Cerveau	Neurocan, brévican	CS
Membrane basale		Perlecan	HS
Surface cellulaire	Liés par une ancre GPI	Glypicans	HS
	PG transmembranaires	CD44, bétaglycan syndécans	HS, CS
Intracellulaire		Serglycine	HS (héparine), CS

1. Les protéoglycannes intracellulaires

Le protéoglycanne intracellulaire type est représenté par la serglycine. La serglycine est un petit protéoglycanne qui est abondant dans les granules de sécrétion des mastocytes, des basophiles et des cellules NK (*Natural killer*). Il porte en général deux types de chaînes GAGs, des chaînes héparine ou chondroïtane sulfate (Schick *et al.*, 2001). Le core protéique de la serglycine est le plus petit des cores protéiques connus (10-15 kDa). La serglycine est formée de la répétition de 9 à 24 unités de sérine-glycine sur lesquelles se greffent 7 à 15 chaînes GAGs. Après sa synthèse, le core protéique est clivé à son extrémité N-terminale pour donner la protéine mature (Avraham *et al.*, 1989). Dans les granules de sécrétion, la serglycine et autres protéoglycannes intracellulaires jouent un rôle d'agent protecteur et/ou modulateur pour différents facteurs inflammatoires comme les cytokines, les chimiokines et les protéases en les transportant sur les sites cibles où ils sont sécrétés (Schick *et al.*, 2001).

La serglycine présente dans les mastocytes de la muqueuse est le seul protéoglycane à porter des chaînes GAGs correspondant à l'héparine (Yurt *et al.*, 1977 ; Bourdon *et al.*, 1985 ; Kolset & Gallagher, 1990 ; Schick & Senkowski-Richardson, 1992 ; Humphries *et al.*, 1999). Ces chaînes (MM = 5000-25000 Da) sont stockées dans les granules de sécrétion cytoplasmiques dans des complexes non-covalents formés avec des protéines basiques (Conrad, 1998). La serglycine de la plupart des cellules sanguines et des cellules endothéliales porte des chaînes chondroïtanes sulfates très sulfatées (Stevens *et al.*, 1987 ; Stevens & Austens, 1989).

2. Les protéoglycannes extracellulaires

Ces protéoglycannes sont sécrétés après biosynthèse complète et ne sont jamais attachés à la surface cellulaire (Iozzo, 1998). Ils participent avec l'acide hyaluronique, le collagène et la fibronectine à l'assemblage de la matrice extracellulaire et lui confèrent certaines propriétés rhéologiques telles que l'hydratation et la résistance aux forces compressives. On distingue quatre familles de protéoglycannes matriciels : la famille des hyalectanes, la famille des protéoglycannes riches en leucine, la famille du perlécan et l'endocan.

a. La famille des hyalectanes

Les hyalectanes regroupent les protéoglycannes qui interagissent avec l'acide hyaluronique et les lectines (Iozzo, 1998). Le point commun entre ces protéoglycannes est leur structure en trois domaines : un domaine N-terminal qui fixe l'acide hyaluronique (Le Baron *et al.*, 1992 ; Iozzo, 1998), un domaine central qui porte les chaînes GAGs, et le domaine C-terminal capable de fixer des lectines (Iozzo, 1998).

α. L'aggrécan

L'aggrécan est le plus grand de tous les protéoglycannes. Il est constitué d'une centaine de chaînes chondroïtanes sulfates de 20 à 60 kDa, d'environ 30 chaînes kératanes sulfates et d'un petit nombre de N-glycannes (Silbert *et al.*, 1997 ; Iozzo, 1998). La partie N-terminale s'organise en 2 domaines globulaires et est impliquée dans la fixation de l'acide hyaluronique et d'une centaine de monomères d'aggrécan. Cela contribue à former un large complexe multimoléculaire qui peut atteindre des masses allant de 100 000 à 200 000 kDa. Les interactions sont stabilisées par des protéines qui font le lien entre les différents membres de ce complexe multimoléculaire (Iozzo, 1998).

L'aggrécan est le protéoglycane majeur des tissus cartilagineux et est responsable en partie de ses propriétés mécaniques (Caterson *et al.*, 2000). En effet, la forte concentration de

chaînes GAGs et sa capacité à former de larges agrégats avec l'acide hyaluronique lui confèrent une gigantesque structure polyanionique. L'aggrécan est ainsi capable de retenir un volume d'eau au moins 1000 fois supérieur à son propre volume, conférant ainsi au cartilage une certaine élasticité et la capacité à résister aux stress mécaniques.

β. Le versican

Le versican est un autre composant majeur de la plupart des matrices extracellulaires et du cartilage. Le core protéique du versican est aussi large que celui des aggrécans mais il contient moins de résidus Ser-Gly, ce qui explique qu'il contient moins de chaînes GAGs que l'aggrécan. Le domaine central contient environ 30 sites de liaison pour des chaînes chondroïtanes sulfates.

Le versican est également capable de former des agrégats avec l'acide hyaluronique. Toutefois, en raison de son plus faible nombre de chaînes GAGs, il n'est pas capable de retenir autant d'eau (Silbert *et al.*, 1997). Le versican contribue toutefois à augmenter la rétention d'eau lors des processus de remodelage cellulaire après des blessures ou des cas d'inflammation (Delehedde *et al.*, 2001). D'importants dépôts de versican ont été localisés dans les tissus en prolifération, en particulier dans des zones riches en acide hyaluronique qui sont associées avec l'inflammation (Bensadoun *et al.*, 1997 ; Nara *et al.*, 1997 ; Brown *et al.*, 1999 ; Venkatesan *et al.*, 2000 ; Johnson, 2001). Il serait également impliqué dans l'hydratation du système nerveux central (Bignami *et al.*, 1993) et dans les interactions cellule-matrice *via* ses chaînes GAGs (Silbert *et al.*, 1997). Le versican interagit également avec des chimiokines et module leurs réponses cellulaires (Hirose *et al.*, 2001).

γ. Le neurocan

Le neurocan est un protéoglycane à chaînes chondroïtanes sulfates, cloné à l'origine dans le cerveau de Rat (Rauch *et al.*, 1992). Le neurocan possède des domaines N- et C-terminaux similaires à ceux de l'aggrécan et du versican (Rauch *et al.*, 1992). Il est également capable de former des agrégats avec l'acide hyaluronique *via* l'interaction avec d'autres protéines (Rauch *et al.*, 1991). Le neurocan fixe avec une forte affinité ($K_d = 6$ nM) les molécules d'adhésion cellulaire neuronale, Ng-CAM et N-CAM, contribuant ainsi à inhiber leurs interactions homophiliques et la croissance neuritique (Rauch *et al.*, 2001).

δ. Le brévican

Le brévican est un hyalectane récemment isolé du cerveau qui présente des similitudes avec le neurocan. Comme le neurocan, il existe sous une forme entière et une forme tronquée de sa région de fixation des GAGs et du domaine N-terminal (Yamada *et al.*, 1995). Par ailleurs, en plus des formes sécrétées de brévican, une isoforme ancrée par un GPI a été retrouvée chez le Rat (Seidenbecher *et al.*, 1995).

b. La famille des protéoglycannes riches en leucine

Les principaux protéoglycannes de cette famille sont la décorine, le biglycan, le lumican et la fibromoduline. Ce sont des composés majeurs de la matrice interstitielle. Ils ont été appelés dans un premier temps DSPG ou protéoglycannes non agrégants car ils portent des chaînes dermatanes sulfates et n'interagissent pas avec l'acide hyaluronique (Hocking *et al.*, 1998 ; Iozzo, 1998). Toutefois, seuls la décorine et le biglycan possèdent des chaînes dermatanes sulfates (Gallagher, 1989 ; Kjellén & Lindahl, 1991). Les cores protéiques sont petits (37-45 kDa) et possèdent un domaine central riche en leucine flanqué de part et d'autre par des régions riches en cystéine (Hocking *et al.*, 1998).

α. La décorine

La décorine contient une seule chaîne dermatane sulfate. Elle est impliquée dans la régulation de la formation des fibrilles de collagène. Toutefois, un mutant de décorine qui n'a plus de chaîne dermatanes sulfates est capable de se fixer au collagène, suggérant que c'est le core protéique qui est impliqué dans l'interaction avec le collagène. De la même façon, il a été démontré que le core protéique de la décorine est directement impliqué dans la fixation des TGF (*Transforming Growth Factor*) - β 1, - β 2 et - β 3, faisant de la décorine un réservoir de TGF- β dans le milieu extracellulaire (Yamaguchi *et al.*, 1990 ; Hildebrand *et al.*, 1994). Il apparaît que dans certains systèmes cellulaires, la décorine bloque l'activité du TGF- β (Yamaguchi & Ruoslahti, 1988 ; Yamaguchi *et al.*, 1990), alors qu'elle l'augmente dans d'autres (Kresse *et al.*, 1994 ; Takeuchi *et al.*, 1994). Une autre fonction de la décorine est sa capacité à inhiber la prolifération cellulaire de façon indépendante du TGF- β . En effet, la décorine est un inhibiteur puissant de la croissance. Elle agit directement sur les voies de transduction en conduisant à l'activation de la p21^{Waf1} qui est un inhibiteur de kinases cycline-dépendantes et donc à l'arrêt immédiat en phase G1 (De Luca *et al.*, 1996 ; Santra *et al.*, 1997). Enfin, il a également été montré *in vivo* que la décorine est impliquée dans le processus d'angiogenèse en réponse à un stress inflammatoire (Nelmarkka *et al.*, 2001).

β. Le biglycan

Le biglycan est un autre membre de la famille des protéoglycannes riches en leucine. Il porte deux chaînes dermatanes sulfates. Il a été majoritairement décrit dans la matrice péricellulaire des tissus en développement (Hocking *et al.*, 1998). Le core protéique du biglycan interagit avec de nombreuses protéines de la matrice, comme la fibronectine, les collagènes de type I ou VI (Hildebrand *et al.*, 1994 ; Hocking *et al.*, 1998). La surexpression du biglycan a été observée dans des cas d'inflammation pulmonaire (Bensadoun *et al.*, 1997 ; Venkatesan *et al.*, 2000).

γ. La fibromoduline

La fibromoduline est un protéoglycanne portant des chaînes kératanes sulfates. Elle est notamment retrouvée dans les cartilages et les tendons (Kreis & Vale, 1993). La fibromoduline se fixe aux collagènes de type I et II et influence à la fois la fibrillogenèse mais aussi la structure des fibrilles résultantes (Ezura *et al.*, 2000). Dans certaines pathologies, comme les fibroses pulmonaires, une altération de l'expression de la fibromoduline affecte l'organisation du collagène (Hildebrand *et al.*, 1994 ; Svensson *et al.*, 1999 ; Venkatesan *et al.*, 2000).

δ. Le lumican

Le lumican est un autre protéoglycanne qui porte des chaînes kératanes sulfates. Il est présent aussi bien dans la cornée que dans les parois artérielles (Hocking *et al.*, 1998 ; Funderburgh, 2000). Le lumican joue un rôle de régulateur de la fibrillogenèse du collagène, qui est un processus critique dans la transparence de la cornée (Chakravarti *et al.*, 1998 ; Ezura *et al.*, 2000). Des souris invalidées pour l'expression du lumican montrent des fibres de collagène anormalement épaisses ainsi qu'une opacité de la cornée qui est dépendante de l'âge (Chakravarti *et al.*, 1998). Le lumican faiblement sulfaté est présent dans les cornées pathologiques et contribuerait au recrutement des macrophages dans les régions enflammées. Le lumican est aussi largement présent en tant que glycoprotéine faiblement sulfatée dans les tissus de connexion d'autres organes, tels que le cœur, les reins et les poumons (Chakravarti *et al.*, 1998 ; Hocking *et al.*, 1998).

c. La famille du perlécan

Le perlécan est le protéoglycanne majeur de la membrane basale (Iozzo, 1998). Il est toutefois également présent dans le cartilage (Hassel *et al.*, 1980 ; Costell *et al.*, 1999 ; French *et al.*, 1999). Il possède un core protéique de 400 kDa environ, divisé en cinq domaines (Iozzo *et*

al., 1994). Ses trois chaînes GAGs peuvent être de nature héparane sulfate ou chondroïtane sulfate même si les chaînes héparanes sulfates sont plus fréquentes (Iozzo, 1998 ; Bernfield *et al.*, 1999). Le perlécan est sécrété mais adhère à la surface cellulaire, en partie en se fixant aux intégrines (Hayashi *et al.*, 1992 ; Battaglia *et al.*, 1993 ; Rescan *et al.*, 1993). Le perlécan fonctionne également comme un réservoir bioactif pour des facteurs de croissance en les protégeant de la dénaturation ou de la protéolyse (Saksela *et al.*, 1988 ; Whitelock *et al.*, 1996). Par exemple, la suppression de l'expression du perlécan bloque les activités autocrine et paracrine du FGF-2 sur des cellules de mélanome humain (Aviezer *et al.*, 1997).

d. L'endocan

L'endocan est un protéoglycane soluble. Il est sécrété par les cellules endothéliales et porte une seule chaîne dermatane sulfate (Bécharde *et al.*, 2001). L'endocan est le protéoglycane le plus représenté dans le sang et sa sécrétion est sous le contrôle de cytokines pro-inflammatoires (Lasalle *et al.*, 1996 ; Bécharde *et al.*, 2000).

3. Les protéoglycannes membranaires

Quatre familles de protéoglycannes membranaires ont été décrites.

a. Les syndécans

Les syndécans forment une famille de quatre protéoglycannes transmembranaires codés par des gènes différents (Spring *et al.*, 1994). Ce sont des protéines membranaires de type I constituées d'un peptide signal N-terminal, d'un ectodomaine variable portant les chaînes GAGs, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique C-terminal (Figure 10).

Les domaines extracellulaires (ou ectodomains) des syndécans portent essentiellement des chaînes héparanes sulfates mais peuvent également contenir des chaînes chondroïtanes sulfates aux sites de glycosylation les plus proches de la membrane plasmique (Bernfield *et al.*, 1999 ; Ueno *et al.*, 2001). Les cores protéiques des syndécans sont de taille très réduite par rapport aux chaînes GAGs (Bernfield *et al.*, 1999 ; Rapraeger, 2000 ; Tumova *et al.*, 2000 ; Woods & Couchman, 2000 ; Couchman *et al.*, 2001). Ils ont par ailleurs la capacité à former des oligomères non covalents.

Chez l'adulte, le syndécan-1 est majoritairement exprimé sur les cellules épithéliales et les cellules plasmatiques malignes. Le syndécan-2 (ou fibroglycan) est présent essentiellement sur les cellules endothéliales et les fibroblastes. Le syndécan-3 (ou N-syndécan) est majoritairement localisé au niveau du système nerveux. Le syndécan-4 (amphiglycan, ryudocan) est quant à lui exprimé de façon plus ubiquitaire (Bernfield *et al.*, 1992 ; Bernfield *et al.*, 1999).

Ces dernières années, de nombreux travaux tendent néanmoins à leur donner une répartition cellulaire plus hétérogène.

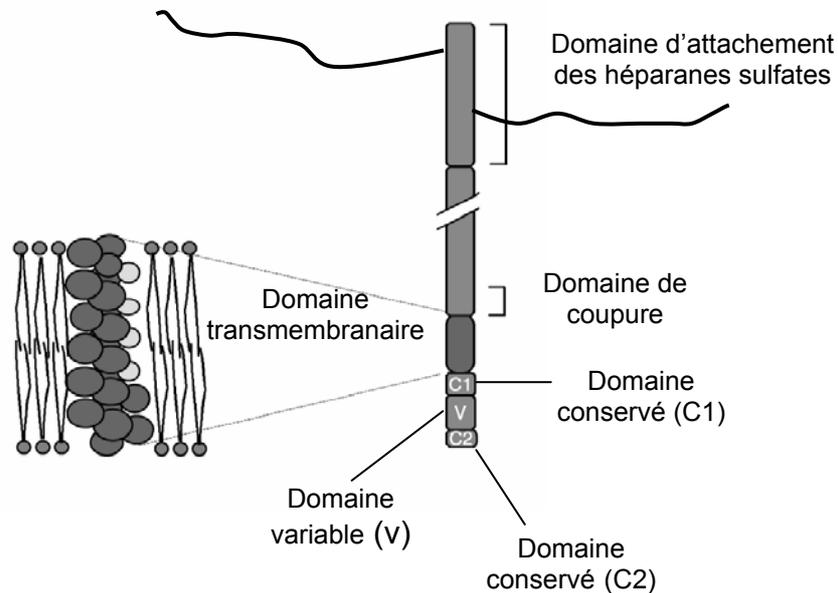


Figure 10 : Représentation schématique des syndécans (Rapraeger, 2001)

Les ectodomaines de chaque syndécan peuvent être libérés par clivage protéolytique, libérant ainsi des HSPG solubles qui gardent les mêmes propriétés de fixation que leurs précurseurs ancrés dans la membrane cellulaire (Elenius *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 1994). La libération de l'ectodomaine est accélérée par le stress cellulaire, les protéinases et les facteurs de croissance relargués au niveau des sites de l'inflammation. Il a été montré que ces ectodomaines maintiennent le facteur de croissance et la balance protéolytique au niveau du site de l'inflammation (Kainulainen *et al.*, 1998 ; Kato *et al.*, 1998).

Les domaines transmembranaires, quant à eux, sont très homologues d'un syndécan à un autre. La raison de la conservation de séquences en acides aminés constituant le domaine transmembranaire semble s'expliquer par l'existence d'une unique et caractéristique séquence dans la dimérisation, voire l'oligomérisation des syndécans ou encore dans l'interaction avec d'autres protéines membranaires (Rapraeger & Ott, 1998).

Enfin, les domaines cytoplasmiques sont courts (≈ 30 acides aminés) et très conservés. Par exemple, la séquence des 13 acides aminés située immédiatement après le domaine transmembranaire est identique pour les 4 syndécans. Deux régions (C1 et C2) présentent de fortes homologies entre les différents membres et sont séparées par une région variable (V) qui

est différente pour chaque syndécan (Rapraeger, 2001) (Figure 10), suggérant que certaines fonctions peuvent être communes aux quatre syndécans et d'autres plus spécifiques.

Les différences structurales entre les syndécans sont le résultat de variations dans le nombre, le type et la structure fine des chaînes GAGs (Kato *et al.*, 1994 ; Sanderson *et al.*, 1994 ; Carey *et al.*, 1997 ; Bernfield *et al.*, 1999). Ces différences structurales des GAGs se traduisent par des différences de capacité de fixation de certains ligands et donc par des fonctions différentes des syndécans. En général, la structure fine des héparanes sulfates semble être liée à la source cellulaire mais non pas aux différentes isoformes des syndécans (Carey, 1997). Ainsi, différents types cellulaires sont amenés à synthétiser des syndécans avec des chaînes GAGs de structures différentes et donc relatives à des activités différentes. Par exemple, les syndécan-1 produits par les cellules épithéliales portent plus de chaînes héparanes sulfates et chondroïtanes sulfates que les syndécan-1 des cellules épithéliales stratifiées (Sanderson & Bernfield, 1988). De la même façon, le syndécan-1 isolé des cellules NIH-3Y3 se fixe à la laminine alors que celui des cellules épithéliales de glandes mammaires n'en est pas capable (Elenius *et al.*, 1990 ; Salmivirta *et al.*, 1994).

Les syndécans qui représentent la forme majeure d'héparanes sulfates à la surface cellulaire sont impliqués dans les processus d'adhésion cellulaire *via* l'activation des intégrines (Rapraeger & Ott, 1998 ; Woods & Couchman, 1998 ; Bernfield *et al.*, 1999 ; Echtermeyer *et al.*, 1999 ; Woods, 2001 ; Yoneda & Couchman, 2003). La participation du syndécan-4 dans la formation des plaques focales d'adhésion suggère que ce syndécan possède un rôle prédominant dans les processus d'adhésion cellulaire (Rapraeger, 2001 ; Bass & Humphries, 2002). Sa surexpression favorise d'ailleurs le réarrangement de l'actine corticale en fibres de stress et augmente également le nombre de plaques focales d'adhésion (Longley *et al.*, 1999).

b. Les glypicans

Les glypicans constituent la deuxième famille de protéoglycannes situés à la surface cellulaire (Figure 11). A l'inverse des syndécans qui possèdent un domaine transmembranaire, les glypicans sont ancrés dans la membrane plasmique par une ancre de nature lipidique, le glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Filmus & Song, 2000 ; Filmus, 2001 ; Filmus & Selleck, 2001 ; Song & Filmus, 2002). Six membres de cette famille ont été identifiés chez les mammifères (Filmus *et al.*, 1988 ; David *et al.*, 1990 ; Stipp *et al.*, 1994 ; Watanabe *et al.*, 1995 ; Saunders *et al.*, 1997 ; Veugelers *et al.*, 1999).

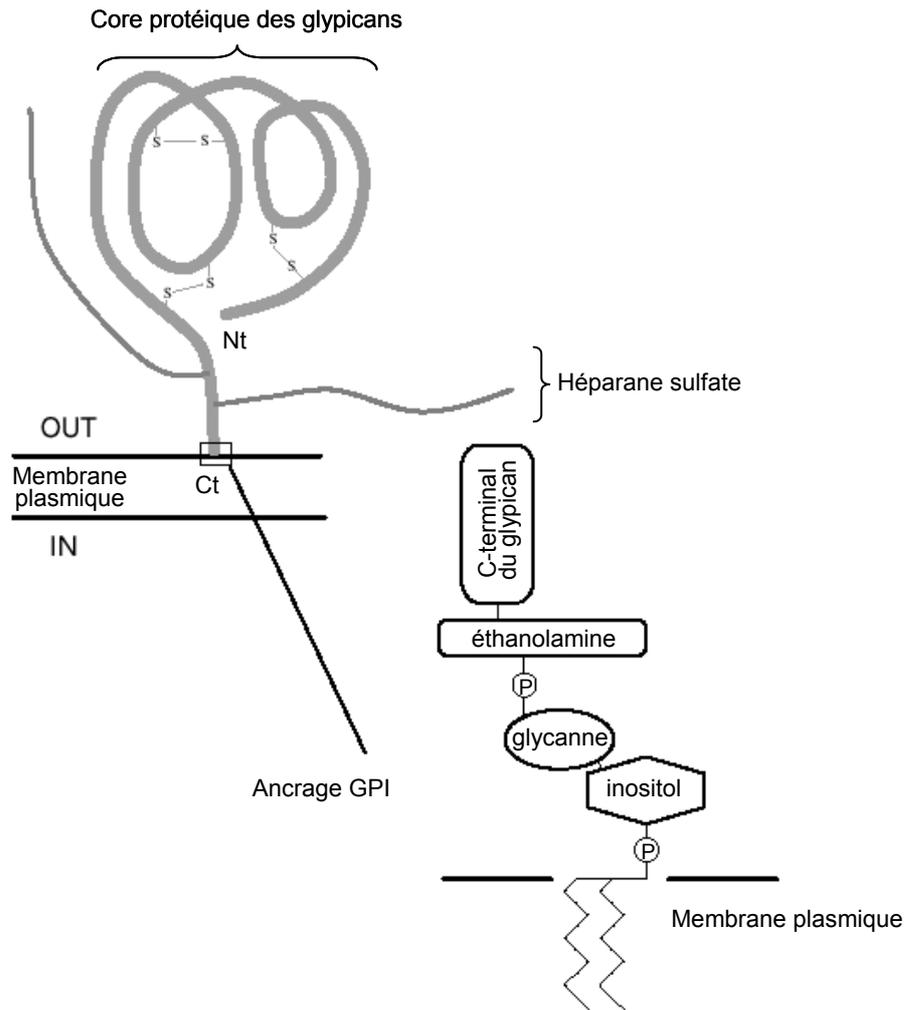


Figure 11 : Représentation schématique des glypicans (De Cat & David, 2001)

Le degré d'homologie entre les différents glypicans est modéré (Veugelers *et al.*, 1999), mais la position de 14 résidus de cystéine est conservée, suggérant que la structure tridimensionnelle des glypicans est très proche (Veugelers *et al.*, 1999 ; De Cat & David, 2001). La taille du core protéique des glypicans est similaire (60-70 kDa) et comme attendu, ils ont tous un peptide signal de sécrétion en position N-terminale, et un domaine hydrophobe nécessaire à l'addition de l'ancre GPI côté C-terminal (Veugelers *et al.*, 1999).

Une autre caractéristique commune aux glypicans est la localisation des sites d'insertion des chaînes héparanes sulfates, qui semblent être réduites aux 50 derniers acides aminés situés dans le domaine C-terminal, plaçant ainsi les chaînes GAGs à proximité de la membrane plasmique (Veugelers *et al.*, 1999). Ces domaines GAGs contiennent des groupes de 2 à 4 séquences d'insertion glycanique Ser-Gly entourés par un ou plusieurs résidus acides. Il a déjà

été préalablement montré que de tels motifs supportent préférentiellement l'attachement de chaînes héparanes sulfates (Zhang *et al.*, 1995). Une caractérisation biochimique du glypican-5 suggère toutefois que des modifications par des chaînes chondroïtanes sulfates sont possibles (Saunders *et al.*, 1997). Cette donnée n'est pas surprenante puisque des molécules hybrides ont déjà été décrites pour les protéoglycannes de la famille des syndécans (Bernfield *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a récemment été montré que le domaine globulaire N-terminal du core protéique peut aussi influencer la classe des GAGs dans les glypicans (Chen & Lander, 2001). Enfin, Siebertz *et al.* (1999) ont mis en évidence une sous-population de glypican sans chaînes GAGs.

En plus de la région contenant les chaînes GAGs, les cores protéiques matures des glypicans contiennent deux autres domaines structuraux : un domaine globulaire N-terminal et un domaine "*linker*". Un site de clivage protéolytique a été mis en évidence pour les glypican-1, -3 et -4 (Watanabe *et al.*, 1995 ; Liang *et al.*, 1997). La signification et la protéase responsables de ce clivage protéolytique restent toutefois encore inconnues. Le produit de clivage généré côté N-terminal reste attaché à la partie C-terminale *via* un ou plusieurs ponts disulfures, restant ainsi indétectable en Western blot si les conditions ne sont pas dénaturantes (Watanabe *et al.*, 1995).

La signification fonctionnelle d'un ancrage GPI pour une protéine n'a pas encore été clairement établie mais plusieurs rôles ont été suggérés (Song & Filmus, 2002). L'un des rôles possibles est de faciliter la localisation des protéines accrochées à la membrane *via* une ancre GPI dans des micro-domaines spécifiques appelés *rafts* (Brown & Rose, 1992). Ces *rafts* sont très riches en sphingolipides et en cholestérol, en kinases de la famille Src, en protéines G et en molécules impliquées dans le flux calcique (Simons & Ikonen, 1997). Le ciblage des glypicans dans ces domaines membranaires faciliteraient les interactions avec des molécules de signalisation en absence de domaine cytoplasmique (Ilangumuran *et al.*, 2000).

Une autre fonction de l'ancre GPI pourrait être un système de régulation de libération de protéines dans l'environnement extracellulaire. Les glypicans peuvent être relargués de la surface cellulaire par clivage non protéolytique par l'action d'une phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) ou d'une glycosylphosphatidylinositol phospholipase D membranaire (PI-PLD) (Ishihara *et al.*, 1987 ; Brunner *et al.*, 1994). Finalement, des données récentes ont montré que les ancres GPI dirigerait les protéines vers des voies d'endocytose spécifiques qui permettraient leur recyclage à la surface cellulaire (Fransson *et al.*, 1998 ; Cheng *et al.*, 2002 ; Ding *et al.*, 2002). Dans le cas des glypicans, il a été montré que le recyclage s'accompagne d'un remodelage des chaînes GAGs et donc d'une modification d'affinité pour certains ligands (Kato *et al.*, 1994 ; Brickman *et al.*, 1998). Ce recyclage serait donc un moyen pour la cellule de réguler l'internalisation de certains ligands dans des contextes cellulaires particuliers.

c. Le CD44

Le CD44 est une protéine transmembranaire de type I exprimée sur la plupart des types cellulaires tels que les leucocytes, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les kératinocytes et quelques cellules endothéliales. La caractéristique principale du CD44 est l'existence de plusieurs isoformes qui sont glycosylées différemment et exprimées spécifiquement dans certains types cellulaires (Bajorath, 2000) (Figure 12). Les différentes isoformes du CD44 sont produites par épissage alternatif d'un seul gène et par modifications post-traductionnelles (Goodison *et al.*, 1999). Toutes les isoformes du CD44 portent un domaine transmembranaire très conservé comprenant 21 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 72 acides aminés (Isacke & Yarwood, 2002). Il semble que le nombre d'isoformes différentes du CD44 soit responsable de la diversité des fonctions biologiques puisque le CD44 est impliqué entre autres dans la domiciliation des lymphocytes, l'hématopoïèse, l'activation des leucocytes mais aussi l'invasion des métastases tumorales (Greenfield *et al.*, 1999). Les analyses *in vitro* sont d'ailleurs très souvent rendues difficiles par le fait que le profil fonctionnel du CD44 dépend en partie de l'expression d'isoformes dépendantes de la cellule mais aussi de l'environnement cellulaire (Lesley *et al.*, 1997 ; Borland *et al.*, 1998).

La région N-terminale, qui contient un domaine de fixation à l'acide hyaluronique, est très conservée entre les différentes espèces de mammifère (85 % d'homologie). La région proche de la membrane est peu conservée (environ 35 à 45 % d'homologie entre les espèces) et contient plusieurs sites de O-glycosylation et d'attachement de chaînes chondroïtanes sulfates. Des variants comprenant différents exons peuvent amener une hétérogénéité supplémentaire puisque, par exemple, l'exon v3 contient une séquence Ser-Gly-Ser-Gly qui peut être substituée par des chaînes héparanes sulfates (Bennett *et al.*, 1995 ; Greenfield *et al.*, 1999).

Alors que les isoformes de CD44 qui portent des chaînes chondroïtanes sulfates sont capables de fixer des composants de la matrice comme le collagène ou la fibronectine, le CD44v3 qui porte une chaîne héparane sulfate peut fixer des facteurs de croissance tels que le FGF-2, l'EGF (Bennett *et al.*, 1995 ; Jackson *et al.*, 1995) ou encore l'HGF (van den Voort *et al.*, 1999). Le CD44 peut d'ailleurs avoir des fonctions de co-récepteur qui modulent la signalisation issue des récepteurs tyrosines kinases (van der Voort *et al.*, 1999 ; van der Voort *et al.*, 2000). Enfin, le CD44 peut faire le lien entre la membrane plasmique et l'actine du cytosquelette *via* la fixation de protéines ERM. Les protéines ERM sont appelées ainsi parce qu'elles regroupent l'eitrine, la radixine et la moésine.

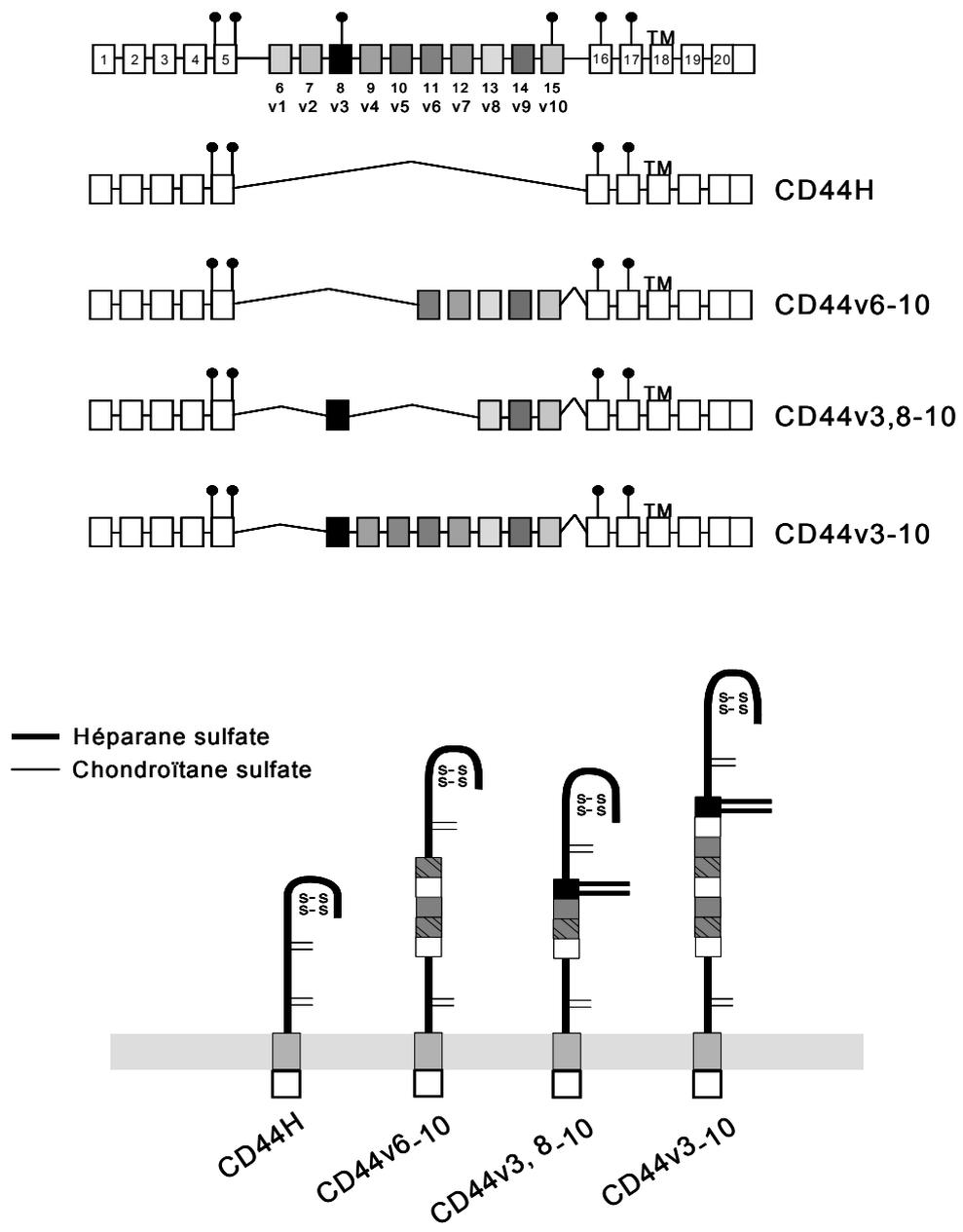


Figure 12 : Représentations schématiques des ARNm (A) et des protéines (B) des isoformes majeures du CD44 (Jackson *et al.*, 1995 ; Jackson, 1997)

Ces trois rôles moléculaires des CD44 permettent de comprendre pourquoi les CD44 peuvent favoriser d'une part, ou inhiber d'autre part la croissance cellulaire et pourquoi ils augmentent la formation de métastase dans certaines tumeurs mais agissent comme des suppresseurs de tumeurs dans d'autres cas (Ponta *et al.*, 2003). Un des mécanismes est la libération de sa partie extracellulaire. Le CD44 circulant qui augmente durant l'inflammation ou la dissémination tumorale peut alors interférer de façon compétitive avec le CD44 membranaire dans la fixation à l'acide hyaluronique (Ahrens *et al.*, 2001).

d. Le bétaglycan

Le bétaglycan est un protéoglycane unique, connu comme étant le récepteur de type III du TGF β . Il est capable de présenter le TGF β aux récepteurs de type II qui sont des récepteurs sérine/thréonine kinases (Lopez-Casillas *et al.*, 1991 ; Gold, 1999).

Il porte des chaînes héparanes sulfates et chondroïtanes sulfates et un petit domaine intracellulaire sans aucun signal associé connu (Lopez-Casillas *et al.*, 1991). La particularité du bétaglycan est sa capacité à fixer le TGF β -1 par son core protéique et ses chaînes GAGs (Reiss & Barcellos-Hoff, 1997 ; Gold, 1999).

Le rôle précis du récepteur de type III dans la signalisation du TGF β n'est pas encore bien établi. Blobe *et al.* (2001) ont identifié une protéine contenant un domaine PDZ, la GIPC (*Gaip-Interaction Protein, C terminus*) qui se fixe à un motif de fixation PDZ de classe I présent dans le domaine cytoplasmique du bétaglycan. Cette interaction est impliquée dans la régulation de l'expression du bétaglycan à la surface cellulaire (Blobe *et al.*, 2001). Cette régulation à un niveau protéique est suffisante pour augmenter les réponses associées au TGF β (Blobe *et al.*, 2001). Toutefois, il a récemment été montré que le bétaglycan pouvait également inhiber la signalisation du TGF β (Lewis *et al.*, 2000 ; Eickelberg *et al.*, 2002). Bien que normalement présent dans la membrane plasmique, le bétaglycan peut subir un processus protéolytique *in vivo*, ce qui a pour conséquence la sécrétion d'ectodomaines solubles. Dans la plupart des cas, cet ectodomaine fixe et séquestre le TGF β , fonctionnant alors comme un récepteur antagoniste (Reiss & Barcellos-Hoff, 1997 ; Gold, 1999 ; Philip *et al.*, 1999).

II - FONCTION DES PROTEOGLYCANNES

La double nature biochimique, qui rassemble au sein d'une même molécule deux entités : protéique et glycanique, est à la base d'un large spectre d'action moléculaire et cellulaire (Silbert *et al.*, 1997 ; Turnbull *et al.*, 2001). D'autre part, en raison de leur localisation stratégique à la surface cellulaire ou dans la matrice extracellulaire, les protéoglycannes sont capables de contrôler l'activité de nombreuses protéines extracellulaires (Hocking *et al.*, 1998 ; Iozzo, 1998 ; Bernfield *et al.*, 1999 ; Funderburgh, 2000 ; Gallagher & Lyon, 2000).

Les protéoglycannes extracellulaires sont impliqués à la fois dans l'assemblage de la matrice (Hildebrand *et al.*, 1994 ; Hocking *et al.*, 1998), dans sa résistance aux forces compressives et dans le maintien de ses propriétés rhéologiques (Iozzo, 1998 ; Caterson *et al.*, 2000). Ils fonctionnent également comme un réservoir de facteurs de croissance ou de chimiokines (Saksela *et al.*, 1988 ; Whitelock *et al.*, 1996), tout en modulant leurs réponses cellulaires (Yamaguchi *et al.*, 1990 ; Hildebrand *et al.*, 1994 ; Hirose *et al.*, 2001). L'implication dans l'inflammation a également été mise en évidence pour certains protéoglycannes de la matrice comme le versican, la décorine ou le biglycan (Bensadoun *et al.*, 1997 ; Nara *et al.*, 1997 ; Brown *et al.*, 1999 ; Venkatesan *et al.*, 2000 ; Johnson, 2001 ; Nelimarkka *et al.*, 2001).

Les protéoglycannes membranaires fixent des molécules de signalisation telles que des facteurs de croissance, des morphogènes ou des cytokines inflammatoires (Bernfield *et al.*, 1999 ; Park *et al.*, 2000 ; Perrimon & Bernfield, 2000 ; Song & Filmus, 2002). Ces facteurs se fixent principalement aux chaînes héparanes sulfates qui portent des groupements sulfates chargés négativement, dont la position et le nombre (Esko & Lindahl, 2001) contribuent à la spécificité des interactions. Dans cette fonction, les protéoglycannes agissent soit simplement comme des récepteurs glycaniques qui présentent le ligand au récepteur, soit comme des molécules de cosignalisation. En somme, les protéoglycannes de la matrice et ceux situés à la surface cellulaire agissent en synergie en régulant l'activité et la biodisponibilité de molécules effectrices. Ils sont également impliqués dans la fixation et l'internalisation de différents agents pathogènes (Spillman, 2001 ; Belting, 2003). Les protéoglycannes se retrouvent ainsi impliqués dans des processus physiologiques très variés comme la morphogenèse, l'hématopoïèse, la défense de l'organisme, le métabolisme énergétique, les processus de cicatrisation, ou pathologiques comme le développement de tumeurs, les inflammations chroniques ou l'infection par des agents pathogènes (Bernfield *et al.*, 1999 ; Alexander *et al.*, 2000 ; Filmus & Selleck, 2001 ; Park *et al.*, 2001 ; Reizes *et al.*, 2001 ; Saphire *et al.*, 2002 ; Song & Filmus, 2002 ; Bobardt *et al.*, 2003).

A - IMPORTANCE DES CHAINES GAGS

Des approches utilisant l'héparine comme compétiteur, de l'héparinase I ou encore des traitements au chlorate pour modifier les chaînes GAGs ont permis de définir un nombre important de ligands pour les HSPG. Ces ligands correspondent notamment à des composés de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance et des cytokines, impliquant ainsi les HSPG dans des processus biologiques très variés (Bernfield *et al.*, 1999 ; Rapraeger, 2000 ; Tumova *et al.*, 2000 ; Woods & Couchman, 2000 ; Couchman *et al.*, 2001).

1. Interaction GAG/protéine

a. Protection et stockage des HBPs

Un rôle majeur des GAGs est la protection des facteurs extracellulaires de la dégradation par des protéases. Ces dernières sont très importantes au niveau des sites de néovascularisation, d'invasion cellulaire ou d'inflammation. Le rôle protecteur des GAGs contre la protéolyse est commun à plusieurs facteurs de croissance. Par exemple, le FGF-2 fixé à l'héparine ou aux héparanes sulfates est protégé de la protéolyse par la plasmine (Saksela *et al.*, 1988). L'interaction avec l'héparine et les héparanes sulfates protège le TGF β de la dégradation protéolytique *in vitro* (McCaffrey *et al.*, 1994) et prévient la formation de complexes inactifs avec la β 2-macroglobuline (McCaffrey *et al.*, 1989 ; Lyon *et al.*, 1997). La fixation de l'IL-7, de l'IFN- γ , du FGF-1 et du FGF-2 à l'héparine ou aux héparanes sulfates les protège de la dégradation protéolytique et de l'inactivation chimique (Gospodarowicz & Cheng, 1986 ; Saksela *et al.*, 1988 ; Lortat-Jacob & Grimaud, 1991 ; Clarke *et al.*, 1995 ; Lortat-Jacob *et al.*, 1996). Durant l'inflammation, l'héparine et les héparanes sulfates peuvent inactiver l'élastase relarguée par les neutrophiles (Flaumenhaft *et al.*, 1990), protégeant ainsi l'IL-8 d'une dégradation rapide par les protéases relarguées (Webb *et al.*, 1993 ; Cadene *et al.*, 1995). De plus, les héparanes sulfates peuvent protéger les facteurs de croissance de la dénaturation thermique (Gospodarowicz & Cheng, 1986). Plus surprenant, le facteur de croissance, lui-même, peut avoir un rôle protecteur vis-à-vis des héparanes sulfates. Ainsi, dans des cellules CHO, il a été montré que le FGF-2 inhibe le clivage des chaînes héparanes sulfates par les héparanases (Tumova & Bame, 1997 ; Tumova *et al.*, 1999).

La séquestration des facteurs de croissance par les héparanes sulfates a été proposée comme un mécanisme prévenant leur diffusion au sein d'un compartiment tissulaire ou entre compartiments tissulaires. Elle permet une réserve locale des facteurs de croissance leur permettant d'agir sur un nombre restreint de cellules. Ce réservoir constitue un moyen de

localiser et de limiter la diffusion des facteurs de croissance tels que le FGF-2 (Flaumenhaft *et al.*, 1990 ; Colin *et al.*, 1999 ; Dowd *et al.*, 1999), le TGF β (McCaffrey *et al.*, 1989 ; Lyon *et al.*, 1997), le VEGF (Houck *et al.*, 1992) et l'IL-8 (Webb *et al.*, 1993). Par ailleurs, les GAGs de la matrice extracellulaire et de la membrane basale constituent un réservoir pour de nombreux facteurs extracellulaires (Damon *et al.*, 1989 ; Sommer & Rifkin, 1989 ; Adams *et al.*, 1994) qui peuvent être alors présentés aux cellules cibles (Roberts *et al.*, 1988 ; Thompson *et al.*, 1990 ; Gallagher & Turnbull, 1992). En général, les GAGs de la membrane basale et de la matrice péricellulaire contiennent une forte densité de sites de fixation pour différentes protéines effectrices dont le mode d'action est le plus souvent de type paracrine. Par conséquent, on peut concevoir un modèle où les protéines "sauteraient" de chaînes GAGs en chaînes GAGs. Tout se passerait comme si les molécules effectrices ne quittaient jamais les GAGs (Lander, 1999). Une situation similaire a été décrite pour des protéines liées à l'ADN (Shimamoto, 1999).

Goger *et al.* (2002) ont d'ailleurs montré que la fixation de l'IL-8 à l'héparine ou aux héparanes sulfates conduit à une stabilisation structurale, ce qui a pour conséquence de prolonger l'effet biologique de la chimiokine.

b. Régulation de la diffusion des HBPs

Les HSPG exprimés à la surface cellulaire peuvent être coupés et relargués comme des HSPG solubles. Ces derniers gardent les mêmes propriétés que leur précurseur cellulaire pour la fixation des facteurs de croissance, suggérant qu'ils puissent jouer un rôle important dans la régulation de leurs activités biologiques. Dans le cas du FGF-2, les héparanes sulfates solubles peuvent agir comme des transporteurs et empêcher l'interaction du FGF-2 avec les HSPG membranaires des tissus, et donc par conséquent assurer la dissémination très loin du site de sécrétion (Flaumenhaft *et al.*, 1990). Par exemple, une PI-PLC et une PI-PLD endogène sont capables de libérer le complexe FGF-2/HSPG qui reste biologiquement actif (Brunner *et al.*, 1991 ; Brunner *et al.*, 1994).

Par ailleurs, la biodisponibilité de différents facteurs est associée à des changements dans l'environnement extracellulaire relatifs ou non à l'action d'endoglycosidases dégradant les héparanes sulfates ou à l'action de protéases clivant le core protéique des HSPG. Ce processus existe dans des conditions physiologiques. Il est par ailleurs fortement amplifié lors de phénomènes biologiques fondamentaux tels que la morphogenèse ou dans des pathologies impliquant un remodelage intense des tissus, comme le cancer et les maladies inflammatoires (Ihrcke *et al.*, 1998 ; Bame, 2001 ; Vlodaysky & Friedmann, 2001).

Les élastases sont des exemples de protéases impliquées dans la libération du FGF-2 fixé aux HSPG de la matrice extracellulaire (Rich *et al.*, 1996 ; Buczek-Thomas & Nugent, 1999). Les élastases leucocytaires et vasculaires peuvent libérer le FGF-2 fixé aux héparanes sulfates, lequel peut ensuite agir comme un agent mitogène puissant des cellules musculaires lisses (Thompson & Rabinovitch, 1996). Les MMPs, sécrétées par de nombreuses cellules inflammatoires comme les neutrophiles et les macrophages, peuvent également participer à la dégradation des cores protéiques des protéoglycannes. Par exemple, les MMP-1, -2, -3, -9 et -13 sont capables de libérer la CyPB associée aux héparanes sulfates des chondrocytes (De Ceuninck *et al.*, 2003). D'autres MMPs, comme les MT-MMPs (*Membrane-type matrix metalloproteinase*), se caractérisent par la présence au niveau de leur extrémité C-terminale d'un domaine hydrophobe transmembranaire assurant leur ancrage dans la membrane plasmique des cellules (Murphy *et al.*, 1999 ; Quaranta, 2000). Ainsi, le CD44 est clivé par une MT-1MMP libérant un fragment du domaine extracellulaire de 70 kDa (Kajita *et al.*, 2001 ; Okamoto *et al.*, 1999a ; Okamoto *et al.*, 1999b).

L'action d'enzymes, telles que les héparanases, est un autre moyen utilisé par l'organisme pour mobiliser les facteurs de croissance qui sont mis en réserve. Les héparanases sont des endo- β -glucuronidases qui clivent les héparanes sulfates d'une façon assez restreinte pour donner des fragments de hauts poids moléculaires. Les héparanases sont exprimées par une variété de cellules incluant les plaquettes, les cellules tumorales et inflammatoires (Bame, 2001 ; Vlodavsky & Friedmann, 2001). L'activité de l'héparanase est d'ailleurs en corrélation avec le potentiel métastatique des cellules tumorales (Vlodavsky *et al.*, 1990). D'autre part, la mobilisation du FGF-2 de la matrice extracellulaire et de la membrane basale par les héparanases joue un rôle dans le remodelage tissulaire ou l'invasion tumorale (Ishai-Michaeli *et al.*, 1990 ; Vlodavsky *et al.*, 1996 ; Kato *et al.*, 1998 ; Nicolson *et al.*, 1998 ; Pikas *et al.*, 1998 ; Vlodavsky *et al.*, 1999). Une autre possibilité pour expliquer la libération du FGF-2 de la matrice extracellulaire n'implique pas la dégradation de cette matrice. En effet, Nugent & Edelman (1992) ont proposé que les héparanes sulfates et les cinétiques d'association et de dissociation du FGF-2 définissaient un réservoir dynamique de FGF-2, capable de relarguer ou d'incorporer ce facteur en réponse à des changements de concentrations locales (Nugent & Edelman, 1992 ; Rahmoune *et al.*, 1998a). Un tel mécanisme a également été proposé dans le cas du HGF (Rahmoune *et al.*, 1998b).

c. Présentation des HBPs

Une propriété commune des HBPs est leur capacité à interagir avec un récepteur fonctionnel et des GAGs sulfatés, par l'intermédiaire de deux régions distinctes de la molécule (Tanaka *et al.*, 1993b ; Silbert *et al.*, 1997 ; Turnbull *et al.*, 2001 ; Capila & Linhardt, 2002). Ainsi, la fixation de ces facteurs aux HSPG permettrait leur présentation au récepteur fonctionnel et modulerait leurs activités. Par exemple, les HSPG exprimés à la surface luminale des cellules endothéliales peuvent fixer les chimiokines produites au niveau des sites de l'inflammation (Tanaka *et al.*, 1998), évitant ainsi leur dilution dans le flux sanguin et permettant d'autre part la formation d'un gradient (Tanaka *et al.*, 1993a ; Najjam *et al.*, 1997). Selon ce modèle, les cellules circulantes vont pouvoir remonter vers le site de l'inflammation en suivant un gradient solide de facteurs chimio-attractants présents sur l'endothélium et dans la matrice extracellulaire (Tanaka *et al.*, 1993a ; Gilat *et al.*, 1994 ; Kuschert *et al.*, 1999). Les chimiokines immobilisées aux GAGs des cellules endothéliales modulent ainsi l'adhésion des cellules immunes à l'endothélium vasculaire et favorisent leur extravasation dans les tissus (Rot, 1992 ; Tanaka *et al.*, 1993a ; Hoogewerf *et al.*, 1997).

De plus, il est maintenant reconnu que les interactions chimiokines/GAGs interviennent dans les mécanismes d'adhésion cellulaire. Par exemple, Gilat *et al.* (1994) ont montré que MIP-1 β et RANTES exercent leur activité pro-adhésive au travers d'interactions avec les GAGs. En effet, la capacité de MIP-1 β et de RANTES à induire l'adhésion des lymphocytes T est anéantie si (i) les chimiokines sont prétraitées avec de l'héparine ou des héparanes sulfates, (ii) si les héparanes sulfates de la matrice extracellulaire sont détruits par une héparinase ou (iii) si les chimiokines fixées à la matrice sont relarguées par prétraitement avec l'héparinase. Par conséquent tout se passe comme si les GAGs situés à la surface cellulaire présentent les chimiokines aux récepteurs transmembranaires, en augmentant la concentration locale de la protéine (Hoogewerf *et al.*, 1997 ; Kuschert *et al.*, 1999). Toutefois, Koopmann & Krangel (1997) ont montré que l'implication des GAGs n'était pas indispensable à la majorité des réponses cellulaires induites par les chimiokines. L'ambiguïté de l'implication des HSPG dans l'activité des chimiokines est peut-être à mettre en relation avec les observations de Proudfoot *et al.* (2003). En modifiant le site de fixation aux GAGs de trois chimiokines (MCP-1, MIP-1 β et RANTES), Proudfoot *et al.* (2003) ont montré qu'elles gardaient leur activité chimiottractante *in vitro* mais pas *in vivo*. De la même façon, des variants monomériques, bien que pleinement actifs *in vitro* sont dépourvus d'activité *in vivo*, suggérant que la fixation aux GAGs et la capacité à former des oligomères sont indispensables à l'activité de certaines chimiokines *in vivo*, bien qu'elles ne soient pas nécessaires pour l'activation du récepteur *in vitro* (Proudfoot *et al.*, 2003).

Par ailleurs, les cellules T cytotoxiques sécrètent des β -chimiokines associées à des protéoglycannes dans des granules de sécrétion, suggérant que cette association physiologique peut remplacer les protéoglycannes membranaires dans la présentation des chimiokines aux cellules cibles (Wagner *et al.*, 1998).

La participation des HSPG dans la présentation et dans la médiation d'un signal soutenu est également vérifiée pour les facteurs de croissance. Par exemple, dans des cellules déficientes en l'expression des HSPG ou traitées à l'héparinase I, la fixation du FGF-2 sur son récepteur protéique est encore capable de générer une cascade de signaux intracellulaires, conduisant notamment à l'activation des MAP-kinases. Toutefois, ces signaux sont de faible amplitude et ne permettent pas d'induire la prolifération des cellules. L'addition de fragments d'héparine est suffisante pour restaurer l'activité mitogène du FGF-2. Cette activité est liée à une stabilisation des interactions entre le FGF-2 et son récepteur, et à la persistance de signaux intracellulaires (Delehedde *et al.*, 2000). Ainsi, les interactions entre le FGF-2 et les héparanes sulfates favorisent la persistance de signaux intracellulaires indispensables à l'activité mitogène de ce facteur (Uhlrich *et al.*, 1986 ; Yayon *et al.*, 1991 ; Delehedde *et al.*, 2000). La présentation de certaines HBPs par les GAGs apparaît donc nécessaire pour induire des réponses cellulaires optimales. Selon ce modèle, les HSPG présents à la surface des cellules pourraient stabiliser les interactions entre un ligand et son récepteur, conduisant à la persistance ou à l'amplification des signaux intracellulaires.

d. Fixation des agents pathogènes

Une des fonctions des héparanes sulfates est la fixation de protéines endogènes, telles que des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion ou encore des enzymes. Outre ces interactions avec des facteurs endogènes, les GAGs et plus spécifiquement les chaînes héparanes sulfates constituent des récepteurs pour différents agents pathogènes (Spillman, 2001).

Parmi les pathogènes connus qui se fixent aux chaînes héparanes sulfates, il y a les parasites comme *Plasmodium falciparum* (Barragan *et al.*, 1999), des bactéries du genre *Chlamydia* (Taraktchoglou *et al.*, 2001) et de nombreux virus dont les herpes virus, les dengue virus, les adénovirus ou des rétrovirus comme le HIV-1 (Spear, 1993 ; Roderiquez *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 1997 ; Harrop & Rider, 1998 ; Trybala *et al.*, 1998 ; Fry *et al.*, 1999 ; Sapphire *et al.*, 1999 ; Shukla *et al.*, 1999 ; Ugolini *et al.*, 1999 ; Qiu *et al.*, 2000 ; Marks *et al.*, 2001).

La fixation à la surface cellulaire est une étape critique dans l'invasion d'une cellule par un virus. En servant de récepteurs membranaires ou de corécepteurs, les chaînes héparanes sulfates des HSPG participent au mécanisme par lequel certains virus infectent leur cellule cible.

Par exemple, le HSV-1 se fixe aux cellules au travers d'interactions de ses glycoprotéines membranaires virales gB et gC avec les héparanes sulfates (Herold *et al.*, 1995 ; Shukla *et al.*, 1999). L'entrée du virus dépend, quant à elle, de la fixation de la glycoprotéine gD aux chaînes héparanes sulfates possédant des résidus de glucosamine 3-O-sulfatée (Shukla *et al.*, 1999).

Plusieurs évidences ont suggéré que les HSPG membranaires étaient également nécessaires à l'attachement du HIV-1 sur les cellules cibles (Oravec *et al.*, 1997 ; Mondor *et al.*, 1998 ; Saphire *et al.*, 1999 ; Saphire *et al.*, 2001). Cette interaction impliquerait des résidus basiques situés sur la boucle V3 de la gp120 (Roderiquez *et al.*, 1995) et la CyPA associée à la membrane virale (Saphire *et al.*, 1999). Des études récentes ont mis en avant le rôle des syndécans dans l'infectivité du HIV-1. En effet, Saphire *et al.* (2001) ont montré que les syndécans favorisaient l'attachement du HIV-1 et représentaient une classe abondante de récepteurs sur les macrophages. D'autre part, les syndécans des cellules endothéliales sont capables de capturer et de protéger le HIV-1. Le virus attaché aux cellules endothéliales peut rester à un stade infectieux pendant plusieurs jours puis être transmis aux lymphocytes T circulants (Bobardt *et al.*, 2003).

Par ailleurs, en plus des molécules d'adhésion virales, les héparanes sulfates jouent un rôle dans l'infectivité *via* la fixation d'une molécule virale effectrice, la protéine Tat. Cette protéine, relarguée par les cellules infectées par HIV-1, est impliquée dans la progression de l'infection du HIV-1 (Ensoli *et al.*, 1993 ; Westendorp *et al.*, 1995) ainsi que dans de nombreuses pathologies associées au HIV-1 (Corallini *et al.*, 1993 ; Ensoli *et al.*, 1994 ; Dewhurst *et al.*, 1996). Elle ressemble à des facteurs endogènes dans sa capacité à se fixer aux héparanes sulfates (Rusnati *et al.*, 1997 ; Rusnati *et al.*, 1999).

2. Spécificité de reconnaissance

Les héparanes sulfates sont des polysaccharides linéaires formés de la répétition d'unités disaccharidiques [acide uronique-glucosamine] sur lesquelles ont lieu des modifications spécifiques telles que l'ajout de groupements sulfates ou l'épimérisation des acides glucuroniques en acides iduroniques. Les charges négatives des groupements sulfates ($pK_a = 2$) et des groupements carboxyliques ($pK_a = 4$) forment des interactions électrostatiques avec des acides aminés basiques de la protéine (Cardin & Weintraub, 1989). Toutefois, il semble que l'interaction entre les protéines et les GAGs soit plus spécifique qu'une simple interaction charge-charge.

Les héparanes sulfates présentent un polymorphisme élevé qui résulte de l'action coordonnée de toutes les enzymes de biosynthèse. Ce polymorphisme élevé repose sur la

longueur des chaînes, le degré de polymérisation, le degré de sulfatation et l'organisation des différentes régions sulfatées. Ainsi, des domaines faiblement sulfatés alternent avec des domaines fortement sulfatés (Lindahl *et al.*, 1998 ; Gallagher, 2001). Ces derniers, également riches en acide iduronique 2-O-sulfate, sont souvent décrits dans les interactions héparanes sulfates/protéines (Turnbull *et al.*, 2001).

Il existe peu d'analyses sur les propriétés physiques des héparanes sulfates. Néanmoins, l'héparine, analogue des domaines NS des héparanes sulfates (Maccarana *et al.*, 1996) a largement été étudiée. L'héparine adopte la conformation d'une hélice relativement rigide, dont le plan de rotation place les groupements sulfates à des intervalles réguliers d'environ 17 Å de chaque côté de l'hélice (Mulloy *et al.*, 1993), soit une distance qui correspond à l'espace entre les groupements positifs des résidus d'acide aminé de plusieurs HBP. En toute probabilité, les domaines NS des héparanes sulfates forment une structure hélicoïdale similaire à celle de l'héparine mais avec une sulfatation plus faible et plus variable. De façon générale, il semble que l'existence d'un épitope unique de fixation spécifique d'une HBP repose sur une combinaison de O et de N-sulfatations, sur la longueur et sur les positions relatives des domaines NA, NS et NA/NS (Lindahl *et al.*, 1998). Toutefois, dans certaines interactions, certains groupements semblent plus importants que d'autres. Le meilleur exemple de spécificité de séquence est le pentasaccharide capable de fixer l'antithrombine III. Ce pentasaccharide contient un groupement 3-O sulfate sur le résidu central de glucosamine N-sulfatée (Lindahl *et al.*, 1980 ; Casu *et al.*, 1981 ; Jin *et al.*, 1997 ; Lindahl *et al.*, 1998 ; Petitou *et al.*, 2003). De la même façon, la glycoprotéine gD du virus HSV-1 reconnaît un motif héparinique bien particulier contenant une glucosamine 3-O-sulfatée (Shukla *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2002).

Toutefois, les arguments pour une spécificité de séquence aussi stricte sont moins évidents même pour d'autres molécules telles que les FGFs qui pourtant ont largement été étudiés ces dernières années (Gallagher, 1998). Ainsi, la présence de groupements N-sulfates est essentielle à la liaison de l'IL-10 (Salek-Ardakani *et al.*, 2000). Au contraire, le PF4 (*Platelet factor 4*) et le HGF nécessitent la présence de groupements O-sulfates pour se fixer aux GAGs (Lyon *et al.*, 1994 ; Stringer & Gallagher, 1997). L'interaction HBP/GAGs est également directement dépendante d'un nombre minimal d'unités disaccharidiques. La technologie du biocapteur IAsys, reposant sur le système d'ondes évanescentes, est un outil adapté à la détermination de la taille minimale d'un oligosaccharide d'héparine capable d'interagir avec une HBP. Ainsi, Delehedde *et al.* ont montré qu'un tétrasaccharide était suffisant à la fixation de l'HGF (Delehedde *et al.*, 2002b) et du FGF-2 (Delehedde *et al.*, 2002c). Il est intéressant de constater que la taille minimale de fixation d'un motif héparinique pour un ligand protéique

donné ne correspond pas forcément à la taille du motif héparinique induisant une réponse maximale. Par exemple, le HGF est capable de se lier à des oligosaccharides de degré de polymérisation 4 (DP4) mais l'activité biologique maximale de ce facteur est observée pour des DPs plus grands (Delehedde *et al.*, 2002b). De la même façon, des DP10 ou DP12 sont nécessaires pour observer l'activité proliférative optimale du FGF-2 (Delehedde *et al.*, 2002c).

Il semble que les régions peu sulfatées des héparanes sulfates soient également impliquées dans la spécificité. Peu d'informations sur la structure physique des régions faiblement sulfatées des héparanes sulfates sont disponibles, mais en comparant les données de plusieurs modèles d'études appropriés, Mulloy & Forster (2000) suggèrent que les liens avec ces régions du polymère sont relativement flexibles. Cela permet aux domaines NS des héparanes sulfates de prendre plusieurs orientations possibles lorsqu'elles sont combinées avec des protéines. Par exemple, il a été proposé que la flexibilité des régions N-acétylées assiste l'interaction simultanée de 2 domaines NS avec des protéines dimériques telles que l'IFN- γ (Lortat-Jacob *et al.*, 1995), le TGF β (Lyon *et al.*, 1997), MIP-1 α (Stringer *et al.*, 2002) et l'IL-8 (Spillmann *et al.*, 1998) qui ont des sites de fixation distincts sur chaque sous-unité. La flexibilité de ces régions N-acétylées a été proposée pour expliquer comment deux domaines NS des héparanes sulfates interagissent avec le tétramère de PF4 (Stringer & Gallagher, 1997), où les sites de reconnaissance des GAGs sont situés de part et d'autre de la protéine. L'organisation même des chaînes héparanes sulfates explique la souplesse de sa conformation et par conséquent son implication dans la spécificité de fixation des différents ligands.

Enfin, un dernier paramètre semble également avoir son importance. Les acides iduroniques dans l'héparine (et sûrement également dans les héparanes sulfates) montrent une grande flexibilité de conformation, puisqu'ils sont capables d'osciller entre les conformations 1C_4 et 2S_0 avec de faibles changements de conformation dans la liaison avec les sucres adjacents (Mulloy & Forster, 2000). L'importance de la flexibilité de l'acide iduronique dans la reconnaissance moléculaire est révélée par cristallographie des rayons X d'un hexasaccharide d'héparine complexé avec le FGF-2 (Faham *et al.*, 1996). Il a d'ailleurs été montré récemment en utilisant des sucres de synthèse que la conformation bateau 2S_0 de l'acide iduronique gouverne l'activité antithrombique de l'héparine (Das *et al.*, 2001). Il existe par ailleurs une autre preuve, indirecte cette fois-ci, de l'importance des acides iduroniques dans les interactions avec les protéines. L'épimérisation des acides glucuroniques des chaînes chondroïtanes sulfates suffit à définir des chaînes dermatanes sulfates. Le nombre très important de protéines qui interagissent de façon commune avec les dermatanes sulfates et les héparanes sulfates souligne l'importance

de la flexibilité de l'acide iduronique dans les interactions avec ces deux GAGs, et ceci, en dépit de leurs autres différences structurales (Gallagher & Lyon, 2000 ; Mulloy & Forster, 2000).

Ainsi, les caractéristiques générales des héparanes sulfates sont compatibles avec la structure d'un polymère très accommodante qui est capable d'adopter des configurations de fixation variables selon les besoins de reconnaissance protéique. Cette accommodation de la chaîne glycanique a déjà été mise en évidence pour l'héparine. L'analyse de structures cristallines de plusieurs complexes héparine/protéine a révélé en effet une distorsion dans l'axe de l'hélice s'ajustant ainsi aux caractéristiques topologiques des régions de fixation de la protéine (Sasisekharan & Venkataraman, 2000 ; Pellegrini *et al.*, 2000).

La spécificité d'interaction entre les chaînes GAGs et les HBPs peut être utilisée par la cellule pour réguler son état. En effet, des changements de structure fine de ces chaînes héparanes sulfates lors du développement, de la différenciation cellulaire ou de processus pathologiques influencent les capacités de fixation de leur ligand et par conséquent les activités physiologiques de ces derniers (Delehedde, 2002).

Par ailleurs, comme les HSPG jouent un rôle déterminant dans l'infectivité de certains virus, une meilleure compréhension des mécanismes et des structures impliquant les héparanes sulfates permettrait d'établir de nouvelles stratégies pour développer des molécules capables d'inhiber l'infectivité de ces virus (Spillman, 2001). Des essais préliminaires ont d'ailleurs été reportés pour le HSV et le HIV-1 où l'héparine a été utilisée comme compétiteur (Rider, 1997). Dans ces essais, l'héparine s'avère plus sélective que les dextrans sulfatés par exemple. L'héparine inhibe la réplication du HIV-1 des cellules CD4+ en culture avec un IC_{50} de 5 $\mu\text{g/ml}$, soit une concentration compatible avec celles observées lorsqu'elle est utilisée comme anticoagulant.

B - IMPORTANCE DU CORE PROTEIQUE

Si les GAGs sont responsables de la spécificité de fixation et de la présentation des HBPs, de nombreux arguments récents suggèrent que les parties protéiques des protéoglycannes peuvent intervenir dans la modulation des mécanismes de signalisation induits par ces facteurs (Oh *et al.*, 1998 ; Ilangumaran *et al.*, 1999 ; Simons & Horowitz, 2001).

Plusieurs données ont mis en évidence que les protéoglycannes situés à la surface d'une même cellule portent des chaînes GAGs ayant les mêmes caractéristiques structurales (Kato *et al.*, 1994 ; Maccarana *et al.*, 1996 ; Lindahl *et al.*, 1998 ; van Kuppevelt *et al.*, 1998). Par exemple, les chaînes héparanes sulfates du syndécan-1 purifiées des cellules épithéliales et des

fibroblastes diffèrent aussi bien dans la structure fine de leurs chaînes GAGs que dans leur capacité à interagir avec des ligands tels que le FGF-2 et le collagène de type-I (Kato *et al.*, 1994). Puisque la structure des chaînes glycaniques semble dépendante du type cellulaire et non de la nature du protéoglycane, l'absence de réponse cellulaire lors de l'inactivation génique ou de la neutralisation d'un protéoglycane membranaire donné démontre que le core protéique de ce même protéoglycane est directement impliqué dans la transmission du signal induit par le ligand. Par exemple, suite à l'injection intrapéritonéale de LPS, les Souris invalidées dans l'expression du syndécan-4 montrent une forte mortalité par rapport aux Souris sauvages (Ishiguro *et al.*, 2001). Cette mortalité s'expliquerait par une diminution de l'effet de la cytokine anti-inflammatoire TGF- β 1, qui ne pourrait plus contrecarrer les effets inflammatoires de l'IL-1 β . La production d'IL-1 β est identique chez les souris sauvages et déficientes en syndécan-4. Comme les autres protéoglycannes ne suffisent pas à maintenir l'effet du TGF- β 1, cela suggère que c'est le core protéique du syndécan-4 qui est impliqué dans l'activité de ce facteur.

Le rôle des HSPG en tant que molécule de co-signalisation est désormais clairement décrit pour les quatre membres de la famille des syndécans, pour les isoformes du CD44 et les glypicans.

1. Les syndécans

a. Fonctions associées aux récepteurs

Le syndécan-1 a été identifié comme un récepteur fonctionnel pour l'HGF favorisant la signalisation depuis son récepteur tyrosine kinase c-Met dans plusieurs myélomes, ce qui résulte en une augmentation de l'activation des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire (Derksen *et al.*, 2002).

Des études ont montré que le syndécan-2 était impliqué en tant que co-récepteur dans l'activité proliférative du GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) pour les ostéoblastes (Modrowski *et al.*, 2000). En effet, l'inactivation du syndécan-2 par des oligonucléotides antisens spécifiques bloque cette activité et l'ajout d'héparine n'est pas suffisant pour la restaurer. Cela suggère fortement qu'en plus de ces chaînes héparanes sulfates, le core protéique du syndécan-2 participe au contrôle de la croissance cellulaire induite par le GM-CSF. Les auteurs ont également montré que la phosphorylation de résidus de tyrosine du syndécan-2 était augmentée après stimulation des ostéoblastes par le GM-CSF (Modrowski *et al.*, 2000).

Les chaînes héparanes sulfates du syndécan-3 sont capables de fixer l'*Heparin-Binding Growth Associated Molecule* (HB-GAM ou pléiotropine). HB-GAM est exprimée dans le cerveau en développement, mais également dans de nombreux tissus non cérébraux.

L'expression de HB-GAM dans le développement du système nerveux semble être liée à la croissance des neurites (Kinnunen *et al.*, 1998a) et à l'extension des axones (Tumova *et al.*, 2000 ; Couchman *et al.*, 2001). La croissance neuritique *in vitro* sur une matrice de HB-GAM est d'ailleurs bloquée en présence d'héparine ou du syndécan-3 soluble, suggérant que la fixation de HB-GAM pourrait rassembler le syndécan-3 dans des complexes d'adhésion au niveau des cônes en croissance (Kinnunen *et al.*, 1998a).

Le core protéique du syndécan-4 contribue également à l'activité de certains facteurs. Par la construction de HSPG chimériques, Volk *et al.* (1999) ont montré que la partie cytosolique du syndécan-4 est indispensable à l'activité angiogénique du FGF-2. En effet, des récepteurs chimériques composés du domaine cytoplasmique du syndécan-4 et de domaines extracellulaires de glypican porteur de chaînes héparanes sulfates augmentent la réponse cellulaire au FGF-2. Au contraire, des chimères qui n'ont pas le domaine cytoplasmique du syndécan-4 ne répondent pas (Volk *et al.*, 1999). De plus, la complémentation par l'héparine ou les héparanes sulfates solubles ne permet pas de générer de réponses angiogéniques, suggérant là encore que c'est bien la partie protéique du syndécan-4 qui est impliquée. Le core protéique du syndécan-4 apparaît donc comme un nouvel intermédiaire dans la signalisation du FGF-2, en plus des rôles connus pour les chaînes héparanes sulfates et le récepteur tyrosine kinase. Par ailleurs, cet HSPG semble également jouer un rôle dans la modulation des activités de l'antithrombine III pour laquelle il sert de site de fixation et d'intermédiaire moléculaire dans les événements de signalisation (Dunzendorfer *et al.*, 2001 ; Kaneider *et al.*, 2002).

b. Co-signalisation des syndécans

Les fonctions spécifiques des cores protéiques dans l'assemblage de la matrice, l'adhésion cellulaire, la fixation au cytosquelette ou encore la signalisation ont été étudiées en utilisant des lignées cellulaires. Ces études décrivent un nombre d'interactions protéine-protéine, dont quelques-unes sont communes à tous les syndécans et d'autres, spécifiques à quelques membres seulement. Tous les syndécans possèdent une séquence EFYA dans la région C-terminale intracellulaire qui interagit avec des protéines contenant des domaines PDZ (Woods, 2001) (Figure 13). A ce jour, trois protéines à domaine PDZ ont été identifiées comme capables d'interagir avec les syndécans : la synténine (Grootjans *et al.*, 1997 ; Grootjans *et al.*, 2000), la CASK/LIN (Cohen *et al.*, 1998 ; Hsueh *et al.*, 1998) et la synectine (Gao *et al.*, 2000). Les protéines à domaine PDZ agissent comme des échafaudages moléculaires. Elles sont impliquées dans l'assemblage des récepteurs transmembranaires *via* leur région C-terminale.

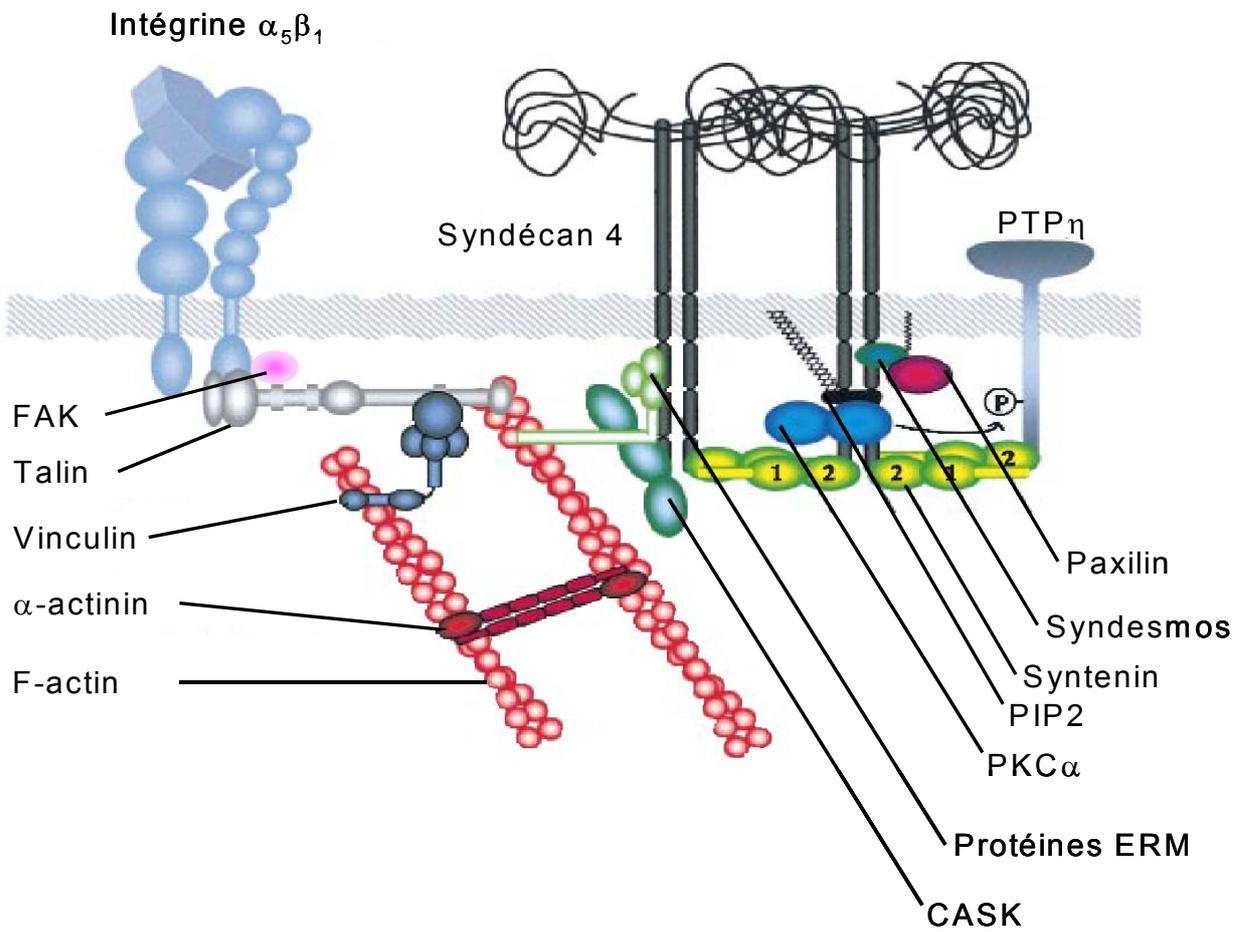


Figure 13 : Représentation schématique d'une plaque focale d'adhésion (Bass & Humphries, 2002)

Dans les plaques focales d'adhésion par exemple, elles font le lien entre ces récepteurs et le cytosquelette, les intégrines et des protéines de signalisation (Craven & Bredt, 1998 ; Sheng & Sala, 2001 ; Bass & Humphries, 2002). Par ailleurs, l'activité des syndécans pourrait être régulée par le recrutement de tyrosines phosphatases. En effet, la synténine interagit avec la région C-terminale de la protéine phosphatase η , et peut recruter des phosphatases transmembranaires dans des complexes protéiques contenant les syndécans (Iuliano *et al.*, 2001).

Les trois protéines à domaines PDZ ont été identifiées par la technique du double hybride. Cette technique a également permis d'identifier la synbindine, une protéine cytoplasmique neuronale capable d'interagir avec le domaine cytoplasmique du syndécan-2. Bien que la synbindine possède des homologues avec plusieurs protéines à domaines PDZ et qu'elle se fixe au motif EFYA de la queue C-terminale du syndécan-2, la synbindine ne contient aucun domaine PDZ classique (Ethell *et al.*, 2000).

Le syndesmos est une protéine ancrée dans la membrane par myristoylation qui se fixe spécifiquement au domaine cytoplasmique du syndécan-4. Sa fixation implique la région variable et la partie proximale de la membrane du syndécan-4 (Baciu *et al.*, 2000 ; Denhez *et al.*, 2002). La surexpression du syndesmos s'accompagne d'une augmentation de l'étalement cellulaire et de la réorganisation de l'actine (Baciu *et al.*, 2000).

La région variable du syndécan-4 forme par ailleurs un complexe ternaire avec le PIP₂ et la PKC α , ce qui conduit à l'hyperstimulation de cette dernière. L'activation de la PKC α par le syndécan-4 est dépendante de l'association avec le PIP₂ (Oh *et al.*, 1998 ; Horowitz *et al.*, 1999 ; Horowitz *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'activité de la PKC α est régulée par phosphorylation du syndécan-4 par la PKC δ . Cette dernière, en phosphorylant le résidu de sérine 138 du domaine cytoplasmique du syndécan-4, empêche l'association avec le PIP₂, ce qui a pour conséquence la désactivation de la PKC α . La PKC δ régule donc la PKC α d'une façon dépendante du syndécan-4 et du PIP₂ (Bass & Humphries, 2002). Enfin, l'interaction entre le syndécan-4 et les facteurs de croissance n'est pas un mécanisme passif d'immobilisation du facteur de croissance au niveau de la membrane. Suite à la fixation du FGF-2, le syndécan-4 est redistribué au niveau de *rafts* membranaires situés à la surface apicale de la cellule (Tkachenko & Simons, 2002), ce qui tend à rapprocher le syndécan-4 du récepteur du FGF-2.

Des protéines de la famille ERM interviennent également dans la formation des plaques focales d'adhésion. Ces protéines ERM possèdent dans leur partie C-terminale un site de fixation à l'actine ainsi qu'un site de fixation à un récepteur transmembranaire. Elles assurent ainsi le lien entre les filaments d'actine et les complexes protéiques membranaires. Par exemple, l'eitrine permet l'association entre le syndécan-2 et le cytosquelette (Granés *et al.*, 2000). Ce phénomène

est dépendant de l'activation de RhoA (Granés *et al.*, 2000). Les GTPases Rho sont connues en effet pour leur implication dans le contrôle de la migration cellulaire (Ridley, 2001) et la polymérisation des molécules d'adhésion et du cytosquelette, notamment les protéines ERM (del Pozo *et al.*, 1999). Saoncella *et al.* (1999) avaient par ailleurs déjà suggéré que le syndécan-4 favorisait la formation des plaques focales d'adhésion et des fibres de stress en activant directement RhoA. En effet, un inhibiteur de Rho bloque la formation des plaques focales d'adhésion et des fibres de stress. Inversement, la stimulation de Rho avec l'acide lysophosphatidique, en absence de regroupement du syndécan-4, conduit à la formation de plaque d'adhésion et de fibres de stress.

Les récepteurs tyrosines kinases ne sont pas les seules tyrosines kinases activées lors de l'adhésion cellulaire à la fibronectine. Les kinases d'adhésion focale (FAK) sont phosphorylées sur les résidus de tyrosine dans les 30 premières secondes d'étalement cellulaire. L'activation de FAK dans les plaques focales d'adhésion dépend du regroupement du syndécan-4 et d'un signal dépendant de Rho mais pas de la PKC (Wilcox-Adelman *et al.*, 2002). FAK peut être toutefois activé de façon indépendante de la formation des plaques focales d'adhésion puisque des intégrines induisent également la phosphorylation de FAK (Defilippi *et al.*, 1994).

La fixation de HB-GAM sur les chaînes héparanes sulfates du syndécan-3 participe au développement du système nerveux (Kinnunen *et al.*, 1998a). La partie cytoplasmique du syndécan-3 est là encore directement impliquée puisqu'elle fixe un complexe de protéines contenant la cortactine, la β tubuline et les tyrosines kinases Src et Fyn (Kinnunen *et al.*, 1998b ; Lauri *et al.*, 1999). Des cellules neuroblastiques N18 transfectées avec le syndécan-3 et mises en contact avec HB-GAM montrent une croissance neuritique dépendante du syndécan-3 qui est bloquée par l'herbimicine A, un inhibiteur des kinases de la famille Src (Kinnunen *et al.*, 1998b). Le complexe HB-GAM/syndécan-3 pourrait ainsi conduire à la phosphorylation par Src de la cortactine et de kinases associées. Enfin, l'association de Src avec la β tubuline pourrait aussi réguler la structure des microtubules au niveau des cones de croissance (Rapraeger, 2001).

c. Régulation de l'expression membranaire des syndécans

La régulation de synthèse des protéoglycannes dépend des conditions physiologiques ou pathologiques qui gouvernent l'état de la cellule mais également du type cellulaire (Carey, 1997 ; Bernfield *et al.*, 1999). Par exemple, dans les fibroblastes, les FGFs induisent l'expression du syndécan-1 par activation du *FGF-inducible response element* (FiRE) (Jaakkola *et al.*, 1997 ; Rautava *et al.*, 2003). La régulation de l'expression des syndécans est également post-transcriptionnelle. L'expression du syndécan-1 est augmentée de 3 à 10 fois sans changement du

taux d'ARNm dans les kératinocytes stratifiés (Sanderson *et al.*, 1992) et dans les cellules mésenchymateuses lors de la formation des reins (Vainio *et al.*, 1989). Au contraire, les tissus de cœur de Rat contiennent des taux élevés de transcrits de syndécan-3, mais le protéoglycane est très difficilement détectable (Asundi *et al.*, 1997). Le syndécan-1 présent à la surface cellulaire des cellules normales diminue à la surface des cellules malignes (Inki & Jalkanen, 1996), alors que les taux d'ARNm restent inchangés dans ces cellules (Kirjavainen *et al.*, 1993 ; Levy *et al.*, 1996). Toutefois, des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β sont capables de diminuer l'expression du syndécan-1 dans les cellules HT-29 au niveau de l'ARNm et de la protéine (Day *et al.*, 2003).

La variabilité d'expression des syndécans ne s'opère pas uniquement entre les différentes isoformes de syndécans mais plutôt entre même syndécan de types cellulaires différents. Par exemple, le syndécan-1 est exprimé par les cellules pré-B dans la moelle osseuse mais est absent des cellules B matures de la circulation sanguine (Sanderson *et al.*, 1989). De plus, le syndécan-1 de différents types cellulaires diffère dans sa structure fine et dans sa capacité de fixation de ligands (Kato *et al.*, 1994). Cela est en accord avec d'autres données qui suggèrent qu'il existe une régulation des chaînes héparanes sulfates d'une façon tissu spécifique (Maccarana *et al.*, 1996 ; Lindahl *et al.*, 1998 ; van Kuppevelt *et al.*, 1998). Comme il existe une spécificité de ligands, la néosynthèse de protéoglycannes est un bon moyen pour la cellule de réguler son état. Les changements de structure fine des chaînes héparanes sulfates influencent les capacités de fixation du ligand et par conséquent les activités physiologiques de ce dernier (Delehedde, 2002).

Les protéoglycannes fixés à la membrane sont soit internalisés par endocytose, soit clivés par protéolyse pour se retrouver ainsi sécrétés dans l'espace extracellulaire (Bernfield *et al.*, 1999). Dans le cas des syndécans, il a été montré que l'ectodomaine libéré par clivage protéolytique garde les mêmes propriétés de fixation que son précurseur ancré dans la membrane cellulaire (Elenius *et al.*, 1992). Il semble que le site de clivage soit défini par une séquence dibasique (pour les syndécan-1, -2, -3) ou par un seul résidu basique (pour le syndécan-4) situés près de la membrane plasmique (Iozzo, 1998 ; Bernfield *et al.*, 1999). Cette coupure des syndécans suggère un rôle physiologique des ectodomains. Par exemple, l'addition d'ectodomains du syndécan-1 dans des lignées de carcinomes mammaires inhibe leur croissance, suggérant que la partie soluble du syndécan-1 est capable de fixer les facteurs de croissance et de moduler leurs activités (Bernfield *et al.*, 1999 ; Gallagher & Lyon, 2000).

Enfin, il existe un exemple de translocation nucléaire du syndécan-1 vers le noyau. Cette translocation est dépendante de la tubuline. Par ce mécanisme, le complexe syndécan-1/tubuline

pourrait servir de navette pour le transport de facteurs de croissance vers le noyau (Brockstedt *et al.*, 2002).

2. Le CD44

a. Fonction associée aux récepteurs

Sur les cellules B activées, van der Voort *et al.* (2000) ont montré l'induction d'un seul HSPG qui correspond à l'isoforme de type héparane sulfate du CD44, le CD44v3. L'expression de cette isoforme sur les lymphocytes B favorise l'activation des voies de signalisation issues de c-Met. Ceci se traduit par une augmentation de phosphorylation du récepteur de l'HGF et de molécules qui agissent plus en aval comme *Grb2-associated binder 1* (Gab1) et Akt/protéine kinase B (PKB). Le CD44v3 agit donc comme un co-récepteur fonctionnel en favorisant les voies de signalisation de l'HGF dans les lymphocytes B (van der Voort *et al.*, 1999 ; van der Voort *et al.*, 2000).

b. Implication du CD44 dans la co-signalisation

La stimulation cellulaire par des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD44 ou des ligands naturels du CD44 activent plusieurs voies de signalisation qui culminent dans la prolifération cellulaire, la sécrétion de cytokine, l'expression de chimiokines et des fonctions effectrices cytosoliques. Par ailleurs, il a été montré que le CD44 fonctionne comme un récepteur de signalisation dans plusieurs types cellulaires (Bourguignon *et al.*, 1998 ; Ilangumaran *et al.*, 1999 ; van der Voort *et al.*, 1999 ; van den Voort *et al.*, 2000). L'un des premiers événements qui suit l'activation du CD44 est la phosphorylation sur des résidus de tyrosine de différents substrats protéiques intracellulaires par des kinases de la famille Src, comme Lck, Fyn, Lyn et Hck.

Outre son implication dans la régulation d'une signalisation spécifique, le domaine intracellulaire des isoformes du CD44 interagit simultanément avec les protéines du cytosquelette (Bourguignon *et al.*, 1998). L'interaction entre l'acide hyaluronique et le CD44 stimule l'activité de la kinase Src, augmentant ainsi la phosphorylation de la cortactine sur les résidus de tyrosine. *In vitro*, ceci diminue la capacité de la cortactine à se lier aux filaments d'actine (Bourguignon *et al.*, 2001a) et facilite la migration des cellules tumorales (Turley *et al.*, 2002). Les Rho-GTPases telles que RhoA et Rac1 participent également à l'interaction entre le CD44 et les protéines du cytosquelette (Turley *et al.*, 2002). La fixation de l'acide hyaluronique au CD44 active les voies de signalisation associées à Rac1, des voies connues pour être impliquées dans la régulation de l'assemblage de l'actine. En particulier, le domaine

cytoplasmique du CD44 fixe des GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) tels que Tiam1 et Vav2. Les GEFs catalysent l'échange GDP-GTP nécessaire à l'activation de Rho et sont impliqués dans la migration des cellules tumorales induite par l'acide hyaluronique (Bretscher, 1999 ; Bourguignon *et al.*, 2000a ; Bourguignon *et al.*, 2000b ; Bourguignon *et al.*, 2001b).

En outre, RhoA est liée de façon non-covalente à l'isoforme CD44_{v3,8-10} dans les cellules tumorales de cancer du sein. Il a été suggéré que le CD44_{v3,8-10} et RhoA activent la kinase dépendante de Rho (ROK), laquelle est impliquée dans la migration des cellules tumorales de cancers du sein (Bourguignon *et al.*, 1999). En effet, la phosphorylation par ROK favorise le recrutement de l'ankyrine, une protéine du cytosquelette associée à la membrane (Bourguignon, 1996 ; Lokeshwar *et al.*, 1996) et nécessaire à l'activation du cytosquelette (Bourguignon *et al.*, 2000b ; Turley *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les 19 premiers résidus du domaine cytoplasmique du CD44 sont impliqués dans l'interaction avec les protéines ERM (Bourguignon *et al.*, 2000a). Legg *et al.* (2002) ont d'ailleurs mis en évidence un mécanisme régulé par la PKC qui contrôlerait l'association entre l'eitrine et le CD44. Ces protéines ERM possèdent le motif KXXn(K/R)K nécessaire à la fixation du PIP2 (Barret *et al.*, 2000). Toutefois, une implication du PIP2 dans la régulation des interactions CD44/ERM associée à la signalisation induite par l'acide hyaluronique n'a pas encore été démontrée (Turley *et al.*, 2002).

c. Régulation de l'expression membranaire du CD44

La régulation de l'expression du CD44 est essentiellement liée à l'expression d'isoformes spécifiques. Par exemple, l'activation *in vitro* des lymphocytes par des anticorps anti-CD3 ou du PMA conduit à la surexpression de l'isoforme CD44v3 (Forster-Horvath *et al.*, 2001). Ces auteurs ont montré que le CD44v3 est présent dans des vésicules des lymphocytes non activés et est probablement exprimé à la surface cellulaire suite à l'activation des lymphocytes. L'augmentation d'expression du CD44v3 a également été reportée pour les monocytes différenciés en macrophages (Jackson, 1997 ; Jones *et al.*, 2000) et les cellules dendritiques dérivant des monocytes (Haegel-Kronenberg *et al.*, 1998).

3. Les glypicans

a. Fonctions associées aux récepteurs

Il semble que les molécules possédant une ancre GPI peuvent également intervenir dans la co-signalisation de différents facteurs. Les Souris déficientes dans l'expression du récepteur pour l'IGF (*Insuline growth factor-II*) (IGF2R) possèdent le même retard de développement que

les souris déficientes dans l'expression du glypican-3 (Lau *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1994). L'IGF2R fixe l'IGF-2 et régule son activité par endocytose et dégradation (Ludwig *et al.*, 1996). Aussi, la Souris déficiente pour l'IGF2R montre une augmentation de la concentration d'IGF-2 dans le sang et les tissus (Lau *et al.*, 1994). Dans le cas des embryons déficients en glypican-3, aucun changement de concentration de l'IGF-2 n'a été observé (Cano-Gauci *et al.*, 1999), suggérant que l'IGF-2 se fixe toujours à l'IGF2R et est endocyté. Comme les souris déficientes en récepteur pour l'IGF montrent le même retard de développement que les souris invalidées pour l'expression du glypican-3, il semble donc que le glypican-3 inhibe les réponses induites par l'IGF-2 en agissant en aval de l'interaction IGF-2/IGF2R (Song & Filmus, 2002).

D'autres auteurs ont également mis en évidence grâce à des souris invalidées pour l'expression du glypican-3 que celui-ci intervenait dans la signalisation de facteurs de croissance tels que le FGF-2, le FGF-7 (KGF) ou le BMP-7 (*Bone morphogenetic protein-7*) lors de la morphogénèse rénale (Grisaru *et al.*, 2001).

b. Implication des glypicans dans la co-signalisation

Comme les glypicans n'établissent pas directement de connections entre les composants intracellulaires, les quelques fonctions de signalisation doivent être forcément indirectes et utiliser des partenaires transmembranaires ou des mécanismes basés sur le regroupement de molécules dans les *rafts* (Simons & Toomre, 2000). Ces *rafts* avec leurs protéines cytosoliques forment des invaginations plasmiques appelées cavéoles (Brown & Rose, 1992 ; Pelkmans *et al.*, 2001). En effet, ces *rafts* contiennent des kinases de la famille Src, des protéines G et des molécules impliquées dans le flux calcique (Simons & Ikonen, 1997). Le ciblage des glypicans dans ces domaines membranaires faciliterait donc les interactions avec des molécules de signalisation, complétant ainsi l'absence de domaine cytoplasmique (Ilangumaran *et al.*, 2000).

c. Régulation de l'expression membranaire des glypicans

Le core protéique d'un protéoglycane contient des signaux importants qui le guident jusqu'à sa destination finale (Fransson *et al.*, 2000). Ainsi, les protéoglycannes avec des domaines transmembranaires ou des ancras GPI ont toujours comme destination finale la membrane plasmique. Les glypicans peuvent être clivés au niveau de l'ancre GPI par une PI-PLC (Ishihara *et al.*, 1987) ou recyclés à la surface cellulaire après resynthèse de nouvelles chaînes GAGs. En effet, certaines données ont suggéré que les ancras GPI dirigerait les protéines vers des voies d'endocytose spécifiques qui permettraient leur recyclage à la surface

cellulaire (Fransson *et al.*, 1998). Dans le cas des glypicans, il a été montré que le recyclage s'accompagne d'un remodelage des chaînes GAGs et de l'acylation de l'ancre GPI lui conférant ainsi une résistance au clivage par la PI-PLC (Fransson *et al.*, 1998). Des études récentes supportent en effet l'existence d'une voie de recyclage endosomale connectant les vésicules d'endocytose indépendantes de la clathrine avec le trans Golgi. Cette voie interviendrait dans le recyclage des glypicans (Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001 ; Nichols, 2002). Ainsi, le recyclage du glypican-1 a été mis en évidence dans des fibroblastes et des cellules endothéliales vasculaires humaines (Fransson *et al.*, 2000). Lors du recyclage du glypican-1, les chaînes héparanes sulfates subissent l'action d'endohéparanases qui agissent aux sites périphériques. Cela se passe dans l'endosome et aboutit à la formation d'oligosaccharides héparanes sulfates et de glycoformes du glypican-1 avec des chaînes héparanes sulfates tronquées (Mani *et al.*, 2000 ; Cheng *et al.*, 2002). Simultanément ou juste après, le core protéique du glypican 1 est progressivement S-nitrosylé sur les résidus de cystéine à partir du NO dérivé de l'arginine. Ensuite, en utilisant le NO relâché des groupements nitrosothiols (SNO) intrinsèques, la dégradation des chaînes héparanes sulfates continue du côté non réducteur par clivage déaminatif au niveau des résidus de glucosamine libre (Ding *et al.*, 2001a ; Ding *et al.*, 2002). Ce processus conduit à la formation de petites chaînes héparanes sulfates qui restent attachées au core protéique puisque les résidus de glucosamine libre sont préférentiellement situés au niveau du lien avec le core protéique (Toida *et al.*, 1997). Sur cette glycoforme, de nouvelles chaînes complètes d'héparanes sulfates peuvent être resynthétisées en utilisant l'acide hexuronique situé à l'extrémité non réductrice comme précurseur.

De façon générale, les modifications des chaînes GAGs lors du recyclage des glypicans sont un moyen de réguler la fixation et l'activité de certains ligands, incluant notamment les polyamines (Mislick & Baldeschwieler, 1996 ; Belting *et al.*, 1999 ; Belting *et al.*, 2002). En effet, l'inhibition de la synthèse endogène des polyamines conduit à un changement structural des chaînes de glypican, qui se traduit notamment par une augmentation d'affinité pour la spermine (Ding *et al.*, 2001b). Les polyamines (putrescine, spermidine et spermine) sont des constituants naturels de toutes les cellules et sont nécessaires à la croissance cellulaire. Généralement, elles sont impliquées dans des processus nucléaires tels que la transcription et l'export d'ARNm (Cohen, 1998). Les cores protéiques des glypicans possèdent d'ailleurs des signaux de localisation nucléaire et ont été localisés dans le noyau de neurones et de cellules gliales (Liang *et al.*, 1997), suggérant que les glypicans puissent participer au ciblage nucléaire des polyamines.

En conclusion, les syndécans, le CD44v3 et les glypicans interviennent dans l'activité de médiateurs protéiques, non seulement en créant des interactions spécifiques avec ces derniers par l'intermédiaire de leurs chaînes glycosidiques, mais également en participant soit en qualité de molécules présentatrices, soit en qualité de co-récepteurs impliqués directement dans la génération de signaux intracellulaires.

Travaux
personnels

CHAPITRE I

Rôle des HSPG dans les réponses cellulaires induites par la CyPB

PARTIE I

**Rôles des héparanes sulfates dans les réponses
induites par la fixation de la CyPB sur les
lymphocytes T**

INTRODUCTION

Les cyclophilines appartiennent avec les FKBP à la grande famille des immunophilines. La CyPA, premier membre de la famille des cyclophilines, a été identifiée comme le principal récepteur intracellulaire de la CsA (Handschumacher *et al.*, 1984, Schreiber, 1991). Elles ont par ailleurs été décrites comme des peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérases (Fischer *et al.*, 1989 ; Takahashi *et al.*, 1989), ce qui a laissé penser qu'elles étaient prioritairement impliquées dans la mise en conformation de protéines (Lang *et al.*, 1987 ; Ivery, 2000). Toutefois, elles ont été mises en évidence dans les liquides biologiques humains comme le lait et le plasma (Spik *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995). Par ailleurs, les CyPA et CyPB sont retrouvées à des taux élevés dans les milieux extracellulaires en réponse à certains stimuli inflammatoires (Tegeder *et al.*, 1997 ; Endrich & Gehring, 1998 ; Jin *et al.*, 2000 ; Liao *et al.*, 2000). Si les mécanismes conduisant à la sécrétion de la CyPA ne sont pas très clairs (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992), il semble en revanche que les taux plus élevés de CyPB soient liés à une augmentation de l'expression et de la sécrétion de la protéine en même temps que de nombreuses chimiokines (Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996).

C'est en 1992 que deux équipes ont mis en évidence pour la première fois une réponse cellulaire liée aux cyclophilines extracellulaires. Ainsi, Sherry *et al.* ont montré que la CyPA sécrétée en réponse aux LPS possédait *in vivo* une activité inflammatoire et *in vitro* une activité chimiotactile pour les monocytes et les neutrophiles du sang. Xu *et al.* ont, quant à eux, mis en évidence une activité chimiotactile de la CyPA pour les éosinophiles et les neutrophiles obtenus par différenciation des cellules de la lignée pro-myélocytaire HL-60.

Ces données ont suggéré que les cyclophilines extracellulaires pouvaient être assimilées à des facteurs inflammatoires. Cela a amené les membres de notre Laboratoire à rechercher l'existence d'éventuels récepteurs à la surface des cellules de l'inflammation. Ainsi, Denys *et al.* (1998b) ont mis en évidence l'existence de deux types de site de fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T. Les sites de type I, insensibles à la force ionique mais altérés par la trypsine ou un pH acide, correspondent au récepteur fonctionnel. Récemment, le CD147 a été identifié comme récepteur potentiel des CyPA et CyPB (Pushkarsky *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002). Toutefois des expériences réalisées dans notre Laboratoire ont montré que la CyPA était incapable de déplacer la CyPB radiomarquée fixée à la surface des lymphocytes (Allain *et al.*, 1994 ; Denys *et al.*, 1998b), suggérant qu'il existe deux récepteurs différents ou que les deux cyclophilines possèdent une nette différence d'affinité pour le même

récepteur. Les sites de type II, sensibles à la force ionique et détruits par l'héparinase I, correspondent à des protéoglycannes portant des chaînes héparanes sulfates. L'existence de deux sites de fixation est une propriété que la CyPB partage avec de nombreux facteurs pro-inflammatoires (Tanaka *et al.*, 1993a ; Tanaka *et al.*, 1993b ; Adams *et al.*, 1994), confirmant l'hypothèse d'un rôle de la CyPB dans les processus inflammatoires.

Les régions de la CyPB impliquées dans la fixation aux deux types de site ont été identifiées grâce à des protéines modifiées par mutagenèse dirigée. L'interaction avec le récepteur de type I implique le domaine conservé des cyclophilines, suggérant que la CyPA et la CyPB sont capables de se fixer sur le même récepteur fonctionnel. La conservation des résidus W¹²⁸ et K¹³², respectivement situés dans les sites de liaison à la CsA et à la calcineurine, tend à confirmer d'ailleurs qu'une partie de la région de fixation au récepteur est commune aux deux cyclophilines (Carpentier *et al.*, 1999b ; Carpentier *et al.*, 2002). En revanche, la région impliquée dans les interactions avec les héparanes sulfates est spécifique de la CyPB. En effet, Carpentier *et al.* (1999b) ont identifié deux clusters (³KKK⁵ et ¹⁵YFD¹⁷) situés dans la partie N-terminale de la molécule qui sont absolument indispensables à l'interaction avec les chaînes héparanes sulfates. L'absence de cette extension N-terminale dans les autres cyclophilines explique pourquoi seule la CyPB est un ligand de haute affinité pour les sites de type II. D'autre part, les régions impliquées dans la fixation aux deux types de sites sont situées de part et d'autre de la molécule de CyPB, suggérant que la CyPB fixée sur les héparanes sulfates peut être présentée à son récepteur fonctionnel. Un tel mécanisme pourrait conduire à l'émergence de signaux intracellulaires complémentaires et expliquer les différences d'activités entre la CyPA et la CyPB.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les réponses communes induites par les CyPA et CyPB chez les lymphocytes T, et recherché si certaines activités spécifiques à la CyPB sont liées à la fixation sur les chaînes héparanes sulfates membranaires.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* :

- **Fabrice Allain, Christophe Vanpouille, Mathieu Carpentier, Marie-Christine Slomianny, Sandrine Durieux and Geneviève Spik** (2002) [Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix.](#) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 2714-2719.

DISCUSSION

La CyPB partage avec les chimiokines la capacité à interagir simultanément avec un récepteur et des protéoglycannes grâce à deux régions différentes (Tanaka *et al.*, 1993b ; Denys *et al.*, 1998b ; Carpentier *et al.*, 1999b). Nous avons voulu savoir si les interactions entre la CyPB et les sites de fixation décrits à la surface des lymphocytes T étaient impliquées dans le recrutement de ces cellules. Nous avons ainsi montré que la CyPB est un facteur pro-inflammatoire pour les lymphocytes T. En plus d'être un facteur chimioattractant, elle est capable d'induire un signal calcique et d'augmenter l'adhésion des cellules T à la matrice extracellulaire par un mécanisme dépendant de l'activation des intégrines de type $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$.

La CyPB n'est pas la seule cyclophiline sécrétée à induire des réponses cellulaires. En effet, la CyPA est également associée à la génération de flux calciques, à l'activation des MAP-kinases et possède une activité chimioattractante (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992 ; Sherry *et al.*, 1998 ; Yurchenko *et al.*, 2002). Nous avons montré que la CyPA est cependant moins efficace que la CyPB pour générer une réponse calcique ou le chimiotactisme des lymphocytes T. Toutefois, la pré-stimulation avec l'une des isoformes rend les cellules insensibles à une seconde stimulation par l'autre cyclophiline. Ces résultats indiquent que la CyPA et la CyPB interagissent avec le même récepteur fonctionnel, et que leur fixation est suffisante pour générer des réponses cellulaires communes.

Récemment, le CD147 a été identifié comme une molécule de signalisation essentielle à l'activité chimiotactile des CyPA et CyPB (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002). Le CD147 est une glycoprotéine impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques, tels que l'induction de MMPs (Ellis *et al.*, 1989 ; Biswas *et al.*, 1995), la régulation des mécanismes d'adhésion et d'agrégation cellulaires (Kasinrerk *et al.*, 1999 ; Cho *et al.*, 2001), ou encore l'activation des lymphocytes T (Koch *et al.*, 1999). L'addition d'anticorps anti-CD147 réduit fortement l'adhésion des lymphocytes T à la fibronectine, suggérant que le CD147 est nécessaire à l'activité de la CyPB. Toutefois, ce même anticorps ne modifie pas la fixation de la CyPB radioactive sur les lymphocytes T, suggérant que l'anticorps anti-CD147 et la CyPB se fixent sur des régions différentes, ou plus simplement que le récepteur de la CyPB et le CD147 sont deux molécules distinctes. Sachant que la fixation de la CyPB sur son récepteur entraîne l'endocytose du site de type I (Denys *et al.*, 1998b), nous avons voulu savoir si la CyPB était responsable de l'endocytose du CD147. Aucune modification de fixation de l'anticorps anti-CD147 n'est observée après pré-incubation des lymphocytes T avec la CyPB pendant 20 minutes à 37 °C.

Cela suggère que le CD147 agirait plus comme une molécule de co-stimulation plutôt que comme un site de fixation pour la CyPB. Le CD147 a d'ailleurs été retrouvé impliqué dans des événements associés au réarrangement du cytosquelette et à l'activation des intégrines de types $\beta 1$ indiquant qu'il est sûrement un régulateur clé dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Berditchevski *et al.*, 1997 ; Kasinrerker *et al.*, 1999 ; Cho *et al.*, 2001).

Si le site catalytique n'intervient pas dans la fixation de la CyPB sur son récepteur, en revanche, l'activité PPIase est indispensable pour induire l'adhésion des lymphocytes T à la fibronectine. En effet, la protéine mutée, dépourvue de cette activité enzymatique, se fixe normalement à la surface des lymphocytes T mais ne génère aucune réponse cellulaire (Carpentier *et al.*, 2002). Le site catalytique est très conservé entre les CyPA et CyPB et pourrait donc expliquer les réponses communes induites par les deux protéines. Des données récentes ont montré que l'activité PPIase est également impliquée dans l'activation des voies associées au CD147 et dans les réponses cellulaires induites par la CyPA. En particulier, une boucle du CD147, contenant la proline P¹⁸⁰, serait directement impliquée dans l'activation de cette molécule par la CyPA. Ces données suggèrent qu'une séquence spécifique du CD147 est un substrat de l'activité PPIase des cyclophilines et que l'isomérisation de cette séquence serait responsable des effets induits par les CyPA et CyPB (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces données suggèrent que le récepteur des cyclophilines serait composé d'au moins deux sous-unités. La sous-unité que Denys *et al.* (1998b) ont identifiée comme étant le site de type I serait à l'origine des différences d'affinité entre les deux cyclophilines pour le récepteur. Quant au CD147, il serait responsable des signaux intracellulaires communs générés par les deux cyclophilines.

Contrairement à ce que nous avons montré pour la CyPB, l'activité chimiotactile de la CyPA serait également dépendante de sa fixation à des HSPG membranaires (Yurchenko *et al.*, 2002). Il est envisageable que l'interaction avec ces molécules soit suffisante pour présenter la CyPA au CD147 et pallier ainsi à la faible affinité de cette cyclophiline pour le site de type I. En revanche, ni la CyPA, ni le mutant CyPB_{KKK} ne sont capables d'induire l'adhésion des lymphocytes T à la matrice extracellulaire. Cependant, la pré-incubation des lymphocytes T avec la CyPA abolit l'activité pro-adhésive de la CyPB. De plus, l'adhésion induite par la CyPB est fortement réduite en présence d'héparine libre, de protamine, ou après traitement de la matrice extracellulaire par l'héparinase I, ce qui indique que la signalisation issue du récepteur de type I est nécessaire mais pas suffisante pour promouvoir l'adhésion cellulaire. A l'instar de ce qui a été décrit pour la fixation du virus HIV-1 associé à la CyPA, les héparanes sulfates seraient

impliqués dans la présentation de la CyPB à son récepteur fonctionnel (Denys *et al.*, 1998b ; Carpentier *et al.*, 1999b ; Saphire *et al.*, 1999). L'interaction héparane sulfate/CyPB pourrait en effet induire des changements structuraux et ainsi stabiliser l'interaction avec le récepteur fonctionnel, conduisant au maintien de l'activation de certaines voies de signalisation. Un tel mécanisme a été proposé pour expliquer la participation des protéoglycannes dans l'activité des facteurs de croissance tels que l'HGF ou le FGF-2 (Delehedde *et al.*, 2000 ; Sergeant *et al.*, 2000). D'autre part, l'interaction CyPB/protéoglycane pourrait activer des voies de signalisation propres au protéoglycane. En effet, l'activation des intégrines est un mécanisme complexe qui peut nécessiter l'émergence de signaux intracellulaires complémentaires à ceux induits par l'activation du CD147. Ces deux mécanismes, à savoir la présentation et la mise en conformation de la CyPB d'une part, ou l'implication des HSPG comme molécules de co-signalisation d'autre part, pourraient également agir en synergie pour promouvoir efficacement l'adhésion des lymphocytes T à la fibronectine.

L'adhésion et la migration cellulaires sont des mécanismes complexes nécessitant l'activation de nombreuses molécules de signalisation intracellulaires telles que des protéines kinases Ca^{2+} -dépendantes, des PI-3 kinases et des petites protéines G. L'ensemble de ces voies aboutit entre autres à une augmentation de l'affinité des intégrines pour leurs ligands protéiques présents sur l'endothélium activé et dans la matrice extracellulaire (Tilton *et al.*, 1997 ; Tanaka, 2000 ; Ridley, 2001 ; Webb *et al.*, 2002). Pour déterminer les voies de signalisation activées lors de l'adhésion des lymphocytes T à la fibronectine, nous avons répété les expériences d'adhésion en présence de toxine pertussique ou de wortmannine. La wortmannine, utilisée à faible concentration, bloque sélectivement l'activité des PI-3 kinases. La toxine pertussique entraîne l'ADP-ribosylation des sous-unités $G_i\alpha$ et bloque les signaux de transduction issus des protéines G. Seule la wortmannine réduit significativement l'activité pro-adhésive de la CyPB, indiquant que les PI-3 kinases sont impliquées dans ce processus.

L'ensemble de nos résultats suggère donc que la CyPB pourrait intervenir *in vivo* dans le recrutement des lymphocytes T en synergie avec d'autres facteurs pro-inflammatoires. Par ailleurs, par ses propriétés biologiques, la CyPB est très proche des chimiokines. Par exemple, comme RANTES, elle agit préférentiellement sur les lymphocytes $CD4^+/CD45RO^+$ (Schall *et al.*, 1990 ; Gilat *et al.*, 1994 ; Taub *et al.*, 1993) et augmente l'adhésion de ces cellules sur la fibronectine, cette dernière activité nécessitant la participation des HSPG membranaires (Oravecz *et al.*, 1997).

La CyPA est moins efficace que la CyPB pour induire un flux calcique et une réponse chimiotactile. Elle ne possède pas en outre de propriété pro-adhésive. Ces données suggèrent que

la fixation sur le récepteur de type I et l'activation des voies couplées au CD147 sont nécessaires pour induire des signaux intracellulaires mais insuffisantes pour obtenir une réponse cellulaire telle que l'adhésion cellulaire par activation des intégrines. La capacité de la CyPB à induire l'adhésion des lymphocytes T à la fibronectine est dépendante de ses interactions avec des protéoglycannes de type héparane sulfate *via* son extrémité N-terminale spécifique. Il reste maintenant à déterminer si le rôle des HSPG dans l'activité pro-adhésive se limite à la présentation de la CyPB au récepteur fonctionnel ou s'ils sont impliqués comme molécules de co-signalisation.

PARTIE II

**Implication des syndécan-1 et -2 dans l'activité
pro-adhésive de la CyPB**

INTRODUCTION

Plusieurs travaux ont mis en évidence que les formes extracellulaires de CyPA et CyPB pouvaient agir comme des médiateurs inflammatoires (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; Allain *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2002). Elles se fixent sur le même récepteur de type I, ce qui est suffisant pour induire un flux calcique et le chimiotactisme des lymphocytes T (Allain *et al.*, 2002). En revanche, seule la CyPB est capable d'augmenter l'adhésion des lymphocytes T à la fibronectine. Cette activité est directement dépendante de l'interaction de la CyPB avec des protéoglycannes de type héparane sulfate (Allain *et al.*, 2002 ; Carpentier *et al.*, 2002).

L'implication des HSPG dans les processus inflammatoires, angiogéniques ou prolifératifs repose sur deux principes fondamentaux. D'une part, ils interviennent en créant des interactions spécifiques avec des médiateurs protéiques par l'intermédiaire de leurs chaînes glycosidiques. Cette interaction contribue à augmenter la spécificité et l'efficacité de fixation du facteur héparinique sur son récepteur fonctionnel (Yayon *et al.*, 1991 ; Tanaka *et al.*, 1993b ; Kuschert *et al.*, 1999). Dans ce mécanisme, les chaînes GAGs peuvent être visualisées comme une main qui présente le ligand à son récepteur sur les cellules cibles. Une telle présentation conduit à la stabilisation des interactions entre le ligand et son récepteur et, par conséquent à la génération de signaux soutenus. Par exemple, les chimiokines sont capables de stimuler l'adhésion des leucocytes *via* l'activation des intégrines lorsqu'elles sont immobilisées sur les GAGs des cellules endothéliales ou de la matrice extracellulaire (Tanaka *et al.*, 1993a ; Gilat *et al.*, 1994).

D'autre part, des données récentes ont mis en évidence que les HSPG intervenaient directement dans la génération de signaux intracellulaires (Rapraeger & Ott, 1998 ; Ilangumaran *et al.*, 1999 ; Woods & Couchman, 2001). Dans ces expériences, l'absence de chaînes héparanes sulfates à la surface cellulaire ne peut pas être substituée par des GAGs solubles ou d'autres protéoglycannes, ce qui est une différence majeure avec le mécanisme de présentation. Les interactions des domaines cytosoliques des protéoglycannes transmembranaires avec le cytosquelette et des molécules de signalisation ont suggéré qu'ils pourraient être impliqués dans la régulation de processus cellulaires liés à l'adhésion, la migration et la prolifération, en étant à l'origine de l'activation de voies de signalisation propre à ces protéoglycannes membranaires. Un tel scénario a été décrit pour les HSPG interagissant avec l'IL-10 (Salek-Ardakani *et al.*, 2000). De même, l'activité du HGF est dépendante des interactions avec le CD44v3, mais pas

avec d'autres HSPG, ce qui indique que les héparanes sulfates et le core protéique du CD44 sont respectivement impliqués dans la fixation et les fonctions de co-stimulation de ce facteur (van der Voort *et al.*, 2000).

Pour déterminer l'implication des HSPG comme molécules de présentation ou de co-signalisation pour la CyPB, nous avons analysé l'expression de ces molécules à la surface des cellules HL-60 différenciées en neutrophiles (HL-60/neutrophiles). Nous avons ensuite déterminé leur implication dans la fixation et l'activité pro-adhésive de cette protéine. La lignée HL-60 est une des nombreuses lignées leucémiques humaines qui peut être différenciée en cellules présentant les caractéristiques histologiques, biochimiques et fonctionnelles des leucocytes. De plus, alors que les cellules HL-60 ne répondent pas à la majorité des facteurs inflammatoires, les HL-60/neutrophiles sont sensibles au fMLP et à d'autres facteurs inflammatoires, faisant de cette lignée cellulaire un modèle d'étude très largement utilisé dans de nombreux processus cellulaires (Koeffler & Golde, 1980 ; Collins, 1987). Dans un premier temps, nous avons vérifié que la CyPB était capable d'induire des réponses cellulaires chez les HL-60/neutrophiles, comme le flux calcique, le chimiotactisme ou encore l'adhésion sur fibronectine. Puis, en se basant sur le fait que les cellules HL-60 non différenciées ne possèdent pas de site de type II pour la CyPB, nous nous sommes servis de ce modèle pour déterminer la nature des HSPG impliqués dans l'activité pro-adhésive de la CyPB.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis à publication dans *Molecular Biology of the Cell* :

- **Christophe Vanpouille, Agnès Denys, Rachel Pakula, Joël Mazurier and Fabrice Allain** Syndecan-1 and -2 serve as co-receptors for cyclophilin B to trigger integrin-mediated cell adhesion to fibronectin.

DISCUSSION

Les CyPA et CyPB sécrétées possèdent une activité de type cytokine et participent aux réponses inflammatoires et à la migration de nombreux types cellulaires (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992 ; Gonzalez-Guadrado *et al.*, 1996 ; Allain *et al.*, 2002 ; Bukrinsky, 2002). La CyPB a notamment été décrite comme une protéine pro-adhésive pour les lymphocytes T (Allain *et al.*, 2002). Cette activité est directement dépendante de l'interaction avec des protéoglycannes de type héparane sulfate, suggérant qu'ils pourraient intervenir comme molécules de co-stimulation. Pour vérifier cette hypothèse et identifier les HSPG impliqués dans l'activité pro-adhésive de la CyPB, nous avons utilisé le modèle cellulaire HL-60. En effet, la CyPA avait déjà été décrite comme un facteur chimioattractant pour les HL-60/neutrophiles (Xu *et al.*, 1992) et pour les neutrophiles du sang (Sherry *et al.*, 1992). Se basant sur ces résultats, nous avons également mis en évidence que la fixation de la CyPB sur son récepteur fonctionnel était suffisante pour induire le chimiotactisme et le flux calcique des HL-60/neutrophiles. Toutefois, ce sont les expériences de fixation de CyPB radiomarquée à la surface des HL-60/neutrophiles qui ont donné une importance significative au choix de ce modèle cellulaire pour les trois raisons suivantes. D'abord, les sites de fixation des HL-60/neutrophiles pour la CyPB possèdent les mêmes caractéristiques que ceux des lymphocytes T. Par ailleurs, les cellules non différenciées ne possèdent pas de sites de type II et ne répondent pas à la CyPB. Enfin, de façon similaire aux lymphocytes T, seule la CyPB est capable d'augmenter l'adhésion des HL-60/neutrophiles à la fibronectine. L'adhésion des HL-60/neutrophiles médiée par la CyPB se fait *via* l'activation des intégrines de type $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$, comme cela avait déjà été décrit pour les lymphocytes T (Allain *et al.*, 2002). Ces données indiquent que les HL-60/neutrophiles et les lymphocytes T répondent à la CyPB de la même façon, faisant ainsi du modèle HL-60 un excellent modèle d'étude pour déterminer la nature et l'implication des HSPG dans l'activité pro-adhésive de la CyPB.

De nombreux arguments sont maintenant en faveur d'un rôle des HSPG membranaires comme régulateurs des activités de cytokines et de facteurs de croissance (Bernfield *et al.*, 1999 ; Selleck, 2000 ; Delehedde *et al.*, 2002a). Ces molécules participent à l'immobilisation de leur ligand et à leur présentation au récepteur fonctionnel. Ce mécanisme a été proposé pour les chimiokines et de nombreux facteurs de croissance (Yayon *et al.*, 1991 ; Tanaka *et al.*, 1993b ; Kuschert *et al.*, 1999). Ils pourraient également servir de co-récepteurs, en facilitant le recrutement de molécules de co-signalisation et en interagissant avec des molécules du cytosquelette par l'intermédiaire de leur partie cytoplasmique. Ceci a été suggéré pour les

syndécans et les CD44, pour qui les chaînes héparanes sulfates et les cores protéiques agiraient respectivement comme des sites de fixation spécifiques et des molécules de co-signalisation (Rapraeger & Ott, 1998 ; Ilangumaran *et al.*, 1999 ; Woods & Couchman, 2001). Des précédents travaux réalisés dans notre Laboratoire ont montré que les régions de la CyPB impliquées dans la fixation aux deux types de sites sont situées de part et d'autre de la molécule (Carpentier *et al.*, 1999b). Cela suggère que la CyPB attachée aux héparanes sulfates peut être présentée au récepteur fonctionnel. Toutefois, il semble que le rôle des HSPG ne soit pas seulement de présenter la CyPB au récepteur fonctionnel. En effet, nous avons montré que l'addition d'héparine n'était pas suffisante pour restaurer l'activité pro-adhésive de la CyPB sur des cellules traitées à l'héparinase I, suggérant que l'héparine ne peut pas remplacer les HSPG membranaires. En outre, le fait que la CyPB_{KKK} est presque aussi efficace que la CyPB pour induire un chimiotactisme indique que le rôle des HSPG n'est pas seulement de présenter et de stabiliser l'interaction de la CyPB avec son récepteur fonctionnel. Cela est cohérent avec les résultats de Carpentier *et al.* (1999b) qui avaient montré que la CyPB et le mutant CyPB_{KKK} se fixent au site de type I avec la même affinité. Ces résultats indiquent que le rôle des HSPG n'est pas seulement de concentrer et de présenter la CyPB à son récepteur fonctionnel mais plutôt d'agir comme des molécules de co-signalisation.

Nous avons démontré ensuite que la fixation aux chaînes héparanes sulfates et l'activité pro-adhésive de la CyPB sont corrélées avec l'expression des syndécan-1 et -2. En effet, des anticorps anti-syndécan-1 et -2 diminuent la capacité de la CyPB à augmenter l'adhésion des HL-60/neutrophiles à la fibronectine, alors que des anticorps dirigés contre d'autres HSPG sont sans effet. Concernant les lymphocytes T du sang, l'activité pro-adhésive de la CyPB fait essentiellement intervenir le syndécan-2. Il semble toutefois que la participation moindre du syndécan-1 soit liée à la plus faible expression de cet HSPG sur les lymphocytes T. Ces données suggèrent que les syndécan-1 et -2 agissent comme des co-récepteurs pour la CyPB en fixant le ligand sur leurs chaînes héparanes sulfates mais surtout en favorisant l'émergence de signaux intracellulaires *via* leur partie cytoplasmique. La description du rôle des syndécans en tant que co-récepteur de facteurs biologiques extracellulaires n'est pas nouvelle. La participation des syndécans comme molécules de co-signalisation a en effet été mise en évidence pour chaque membre de cette famille (Kinnunen *et al.*, 1998a ; Modrowski *et al.*, 2000 ; Simons & Horowitz, 2001 ; Derksen *et al.*, 2002). Tous les syndécans possèdent un motif cytoplasmique conservé qui interagit avec au moins quatre molécules contenant des motifs PDZ. Ces molécules sont la synténine (Grootjans *et al.*, 1997), la guanylate kinase CASK/LIN (Hsueh *et al.*, 1998), la synbindine (Ethell *et al.*, 2000) et la synectine (Gao *et al.*, 2000). Elles sont associées aux

syndécans dans des complexes protéiques organisés et participent au recrutement de protéines de signalisation du cytosol ou de protéines interagissant avec le cytosquelette (Woods & Couchman, 2001). La CyPB serait donc un nouvel exemple de facteur pour qui les syndécans seraient à la fois impliqués dans la fixation spécifique et dans la modulation de ses réponses cellulaires.

De façon tout à fait intéressante, nos résultats établissent également un lien entre le CD147 et les syndécans. Le CD147 a été décrit comme un récepteur fonctionnel des CyPA et CyPB (Pushkarsky *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2001). Nous avons démontré que même si le CD147 n'est sûrement pas directement impliqué dans la fixation de la CyPB, il est toutefois nécessaire comme molécule de co-signalisation dans les réponses médiées par la CyPB (Allain *et al.*, 2002). Le CD147 et les syndécans semblent donc être des composés de co-signalisation du récepteur fonctionnel de la CyPB. Il n'est pas étonnant de retrouver un lien entre le CD147 et les syndécans dans l'activité de la CyPB puisque qu'ils ont tous les deux été décrits comme des cibles potentielles du virus HIV-1. Le CD147 facilite en effet l'entrée du virus en interagissant avec la CyPA associée au virus (Pushkarsky *et al.*, 2001). Les syndécans facilitent quant à eux l'attachement du HIV-1 sur ses cellules cibles (Saphire *et al.*, 2001). Par conséquent, l'implication du CD147 et des syndécans dans le complexe récepteur fonctionnel de la CyPB sous-entend que la CyPB jouerait un rôle clé dans la pathogenèse liée au HIV-1. En détournant les fonctions premières de ce récepteur, le virus pourrait faciliter sa fixation et son entrée dans les cellules cibles. Par conséquent, la compréhension des mécanismes liés à l'activité de la CyPB pourrait permettre de mieux appréhender le rôle exact des syndécans et du CD147 dans l'infection de HIV-1 et pourrait être à la base de nouvelles approches thérapeutiques pour bloquer l'entrée du virus.

Toutefois, l'expression du CD147 et des syndécans n'est pas suffisante pour que les cellules soient capables de répondre à la CyPB. En effet, nous avons démontré que les cellules HL-60 non différenciées expriment le CD147 et les syndécan-1 et -2 sans toutefois être capables d'adhérer à la fibronectine. En outre, les cellules HL-60 non différenciées ou différenciées en éosinophiles n'expriment pas les sites de type II, indiquant que leurs chaînes héparanes sulfates ne sont pas capables de fixer la CyPB. La différenciation en HL-60/neutrophiles conduit donc à l'apparition de motifs héparanes sulfates spécifiquement impliqués dans la fixation de la CyPB. La structure fine des chaînes héparanes sulfates dépend de l'expression et de la régulation des nombreuses enzymes de biosynthèse. Elles sont responsables d'une certaine hétérogénéité dans le nombre et la position de sulfates, dans le nombre des acides iduroniques, contribuant ainsi à la diversité des motifs retrouvés le long des chaînes héparanes sulfates (Lindahl *et al.*, 1998 ; Esko & Lindahl, 2001 ; Esko & Selleck, 2002). La conséquence fonctionnelle de la diversité

moléculaire des chaînes héparanes sulfates est la formation de motifs structuraux définis qui sont responsables de la fixation spécifique de certains ligands (Lindahl *et al.*, 1998 ; Gallagher, 2001). Des travaux antérieurs avaient démontré que l'hétérogénéité de fixation de la CyPB sur les lymphocytes du sang était liée à l'expression différentielle du site de type II sur les sous-populations (Denys *et al.*, 1997 ; Denys *et al.*, 1998b). La présence du site de type II sur les lymphocytes T CD4+/CD45RO+ expliquerait alors la sélectivité d'action de la CyPB vis-à-vis de cette sous-population (Allain *et al.*, 2002). Par ailleurs, nous avons démontré que les neutrophiles du sang n'adhèrent pas à la fibronectine en présence de CyPB, ce qui apparaît également lié à l'absence de sites de type II. Les cellules HL-60 non différenciées possèdent des chaînes héparanes sulfates mais ne possèdent pas de site de fixation glycanique spécifique de la CyPB, suggérant que c'est l'expression de certaines enzymes de synthèse lors de la différenciation en neutrophiles qui est responsable de l'apparition du site de fixation de type II. Le modèle HL-60 semble alors très intéressant pour déterminer les caractéristiques structurales des motifs héparanes sulfates reconnus par la CyPB et analyser la régulation de la machinerie enzymatique responsable de l'apparition de ces motifs sur les cellules cibles. Par ailleurs, la concentration en CyPB est augmentée dans diverses pathologies et dans des cas d'infection par le HIV-1 (Sherry *et al.*, 1992 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; Tegeder *et al.*, 1997 ; Endrich & Gehring, 1998 ; Jin *et al.*, 2000). Par conséquent, la caractérisation de la structure fine des sites de type II sera particulièrement intéressante pour établir une stratégie basée sur le développement de molécules dérivées d'héparanes sulfates capables de bloquer ces interactions et de contrôler les effets médiés par la CyPB dans ces pathologies.

CHAPITRE II

Spécificité d'interaction entre la CyPB et ses motifs hépariniques

PARTIE I

**Etude du motif héparinique minimal
impliqué dans les interactions avec la CyPB.
Analyse par retard sur gel**

INTRODUCTION

La CyPB partage avec de nombreux facteurs inflammatoires la capacité à interagir avec un récepteur protéique et des HSPG (Delehedde *et al.*, 2002a). Nos travaux antérieurs ont montré que les HSPG, identifiés comme étant les syndécans-1 et -2, sont directement impliqués dans l'activité de la CyPB. Dans un modèle de co-récepteur, l'interaction simultanée du ligand avec ses récepteurs protéiques et ses sites glycaniques permet le rapprochement du core protéique des protéoglycannes avec les récepteurs fonctionnels. Cela favorise l'émergence de signaux supplémentaires et l'interaction entre des molécules du cytosquelette et la partie cytoplasmique des HSPG (Rapraeger & Ott, 1998 ; Ilangumaran *et al.*, 1999 ; Woods & Couchman, 2001). Ce modèle n'est pas exclusif et peut être complété par un modèle plus classique de présentation des HBPs par les héparanes sulfates. En effet, les chaînes glycaniques des syndécans-1 et -2 pourraient également servir de bras qui présenteraient correctement le ligand à son récepteur fonctionnel, comme cela a été montré pour d'autres facteurs (Tanaka *et al.*, 1993b ; Kuschert *et al.*, 1999).

La caractérisation du motif structural impliqué dans les interactions avec la CyPB est nécessaire pour comprendre l'importance des chaînes héparanes sulfates dans la fixation et l'activité pro-adhésive de la CyPB. Parmi les caractéristiques fonctionnelles de ce motif de fixation, la taille joue un rôle important. En effet, Delehedde *et al.* (2002) ont montré que des tétrasaccharides hépariniques sont suffisants pour fixer le FGF-2. En revanche, des oligosaccharides de taille plus grande (DP10-DP12) sont nécessaires à l'activité proliférative de ce facteur. Le domaine de fixation du dimère d'interleukine-8 correspond à deux domaines hexasaccharidiques séparés au moins par sept unités disaccharidiques (Spillman *et al.*, 1998). Toutefois, il a été montré que des disaccharides hépariniques sont suffisants pour inhiber les propriétés pro-inflammatoires de l'interleukine-8 (Kuschert *et al.*, 1998). La taille est donc une caractéristique importante du site de fixation d'une HBP, puisqu'elle peut influencer des phénomènes de dimérisation du ligand mais également favoriser des interactions avec le récepteur protéique.

La source de motifs héparanes sulfates spécifiques est limitée sur les lymphocytes T. Toutefois, la structure de l'héparine est similaire aux régions fortement sulfatées des héparanes sulfates, et des travaux antérieurs réalisés dans notre Laboratoire ont montré que l'héparine et les sites de types II présents sur les lymphocytes T possédaient les mêmes capacités d'interaction avec la CyPB (Denys *et al.*, 1998b). Par conséquent, nous avons utilisé des oligosaccharides

dérivés d'héparine pour déterminer la longueur du motif reconnu par la CyPB. L'interaction a été analysée en utilisant une stratégie basée sur le principe de retard sur gel en condition non dénaturante (Wu *et al.*, 2002). Les oligosaccharides non retardés ou complexés à la CyPB ont été visualisés grâce au marquage préalable par un fluorophore, l'acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique (ANTS) (Jackson, 1994). Finalement, l'importance de la taille du motif héparinique dans l'activité biologique de la CyPB dépendante des héparanes sulfates a été testée en analysant la capacité des oligosaccharides hépariniques à moduler l'adhésion des lymphocytes T à la fibronectine.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis à publication dans *Biochemical Journal* :

- **Christophe Vanpouille, Agnès Denys, Mathieu Carpentier, Rachel Pakula, Joël Mazurier and Fabrice Allain.** Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of Cyclophilin B to heparin and cell surface heparan sulphate.

DISCUSSION

La CyPB interagit fortement avec l'héparine, puisque son élution d'une colonne d'héparine-Sépharose nécessite la présence d'une solution NaCl 0,6 M (Denys *et al.*, 1998b). En revanche, les mutants CyPB_{KKK}- et CyPB_{ΔYFD} ont une plus faible affinité pour l'héparine. En effet, la CyPB_{KKK}- est éluée de la colonne d'héparine-Sépharose à 0,1 M NaCl alors que la CyPB_{ΔYFD} est éluée à 0,3 M. Ces données suggèrent que le tripeptide ³KKK⁵ est impliqué dans des interactions ioniques alors que le tripeptide ¹⁴YFD¹⁶ interviendrait en stabilisant le complexe CyPB/héparine (Carpentier *et al.*, 1999b). Les résultats obtenus par la technique de retard sur gel en condition non dénaturante confirment l'importance de ces deux séquences dans les interactions avec l'héparine. En effet, nous avons démontré qu'un octasaccharide d'héparine correspond à la taille minimale capable d'interagir avec la CyPB alors que les mutants CyPB_{KKK}- et CyPB_{ΔYFD} ne sont pas capables de former des complexes avec ces mêmes DP8. De plus, la modélisation moléculaire de la CyPB montre que les deux tripeptides ³KKK⁵ et ¹⁴YFD¹⁶ sont arrangés dans la structure tridimensionnelle de la CyPB de telle façon qu'ils délimitent une gouttière dans laquelle un motif octasaccharidique peut se loger. Cette observation permet d'expliquer pourquoi les DP4 et DP6 interagissent faiblement avec la CyPB. Les deux séquences ³KKK⁵ et ¹⁴YFD¹⁶ agiraient donc en synergie dans la fixation du motif héparinique en délimitant la zone d'interaction avec ce motif. Ainsi, l'implication d'une seule des deux séquences n'est pas suffisante pour former un complexe stable entre la CyPB et les DP8. L'importance du tripeptide YFD a déjà été décrite dans les interactions entre le collagène de type IV et les chaînes héparanes sulfates. Cette séquence est localisée dans la discontinuité de la triple hélice du collagène et semble cruciale pour induire l'adhésion cellulaire aux HSPG (Koliakos *et al.*, 1989).

La taille minimale nécessaire à la fixation de la CyPB à la surface des héparanes sulfates des lymphocytes T semble également être un octasaccharide. En effet, la formation du complexe CyPB/héparanes sulfates marqués à l'ANTS n'est inhibée efficacement qu'en présence de DP8 ou d'oligosaccharides de taille supérieure comme compétiteurs. De plus, nous avons montré que l'addition de DP8 réduit fortement l'activité pro-adhésive de la CyPB. Cependant, des oligosaccharides de tailles plus grandes ne sont pas plus efficaces pour inhiber l'adhésion cellulaire induite par la CyPB, suggérant que l'augmentation de taille n'augmente pas les capacités d'inhibition des oligosaccharides dans les tests d'adhésion. A l'inverse, la compétition par les DP4 et DP6 est très faible et n'est observée seulement qu'à de fortes concentrations. Dans des travaux récents, nous avons montré que les CyPB_{KKK}- et CyPB_{ΔYFD} étaient toutes les deux

incapables d'induire la fixation des lymphocytes T à la fibronectine (Carpentier *et al.*, 2002). Ces données indiquent que l'absence d'une des deux séquences est suffisante pour altérer les réponses cellulaires de la CyPB dépendante des héparanes sulfates. Cela suggère que les séquences ³KKK⁵ et ¹⁴YFD¹⁶ sont également impliquées dans la fixation de la CyPB aux chaînes héparanes sulfates des lymphocytes T. Le mutant CyPB_{ΔYFD}, qui possède la séquence ³KKK⁵, est incapable d'induire l'activité pro-adhésive de la CyPB. Toutefois, il est suffisant pour interagir faiblement avec l'héparine. En effet, il est élué de la colonne d'héparine-sépharose à 0,3 M en NaCl. Par conséquent, il est possible que les DP4 et les DP6 interagissent avec les trois lysines de façon indépendante du tripeptide ¹⁴YFD¹⁶. Ces faibles interactions pourraient expliquer l'inhibition partielle de l'activité pro-adhésive de la CyPB observée en présence de fortes concentrations de DP4 et DP6.

Le premier rôle proposé pour les chaînes héparanes sulfates dans la modulation des réponses cellulaires est d'induire un changement de conformation tridimensionnelle du ligand. Ce changement de conformation serait impliqué dans une meilleure efficacité d'interaction avec le récepteur fonctionnel (Yayon *et al.* 1991 ; Tanaka *et al.*, 1993b ; Kuschert *et al.*, 1999). Nos travaux ont montré que les mutants CyPB_{KKK} et CyPB_{ΔYFD} possèdent les mêmes caractéristiques de fixation que la CyPB pour les sites de type I (Carpentier *et al.*, 1999b) et gardent leur capacité à induire le chimiotactisme des lymphocytes T (Allain *et al.*, 2002). De même, le traitement des cellules à l'héparinase I n'altère ni la capacité de la CyPB à interagir avec le site de type I (Denys *et al.*, 1998b) ni la capacité à induire un chimiotactisme (Allain *et al.*, 2002). Ces données indiquent que les chaînes héparanes sulfates ne sont pas nécessaires à la fixation de la CyPB sur son récepteur de type I. En revanche, elles sont absolument nécessaires à l'activité pro-adhésive du facteur, suggérant que les héparanes sulfates sont impliqués dans la modulation de certaines réponses cellulaires de la CyPB (Carpentier *et al.*, 2002 ; Allain *et al.*, 2002). Nous avons démontré que des octasaccharides réduisent les interactions avec les héparanes sulfates membranaires et inhibent l'adhésion cellulaire médiée par la CyPB. En revanche, ils sont incapables de restaurer l'activité pro-adhésive de la CyPB de lymphocytes T traités à l'héparinase I. Par conséquent, il semble que le rôle des héparanes sulfates ne soit pas réduit à une modification de conformation de la CyPB, qui serait nécessaire à la présentation de la protéine sous une forme biologiquement active.

Des travaux récents ont montré que la taille minimale de fixation d'un motif héparinique pour un ligand protéique donné ne correspond pas forcément à la taille du motif nécessaire pour induire une réponse cellulaire optimale. Par exemple, le HGF est capable de se lier à des DP4 mais l'activité biologique maximale du HGF est observée pour des oligosaccharides plus grands.

Cette activité s'expliquerait par l'implication des héparanes sulfates dans la formation d'une interaction stable entre le HGF et son récepteur fonctionnel c-Met (Delehedde *et al.*, 2002b). Par ailleurs, les chaînes héparanes sulfates pourraient faciliter la dimérisation de certains facteurs, favorisant ainsi leur activité (Spillman *et al.*, 1998 ; Schlessinger *et al.*, 2000). Par exemple, un monomère de FGF-2 peut se fixer et activer son récepteur fonctionnel. En revanche, les réponses prolifératives de ce facteur de croissance sont dépendantes de la persistance de signaux issus de la dimérisation du récepteur. Dans la plupart des cas, les fonctions des héparanes sulfates membranaires peuvent être remplacées par des héparanes sulfates solubles ou de l'héparine, indiquant que les HSPG membranaires des cellules voisines ou de la matrice extracellulaire pourraient promouvoir l'activité des chimiokines ou des facteurs de croissance. Dans nos expériences, nous avons montré que l'activité pro-adhésive de la CyPB sur les cellules traitées à l'héparinase I n'était pas restaurée par de l'héparine soluble ou immobilisée, indiquant que le rôle des héparanes sulfates n'est pas limité à la formation d'un dimère de CyPB ou à la stabilisation des interactions entre la CyPB et son récepteur. En revanche, nous avons montré que les syndécans-1 et -2 agissent comme des co-récepteurs pour la CyPB, ce qui confirme que les héparanes sulfates doivent être présents à la membrane des cellules cibles pour moduler l'activité de ce facteur. D'autres exemples de l'implication des HSPG comme molécules de co-signalisation ont déjà été décrits dans la littérature. En effet, le syndécan-2 est impliqué dans la fixation du GM-CSF aux ostéoblastes et semble agir comme un co-récepteur fonctionnel dans la modulation de l'activité mitogène et la signalisation de cette cytokine (Modrowski *et al.*, 2000). Le syndécan-4, mais pas d'autres HSPG a été décrit comme favorisant la fixation du FGF-2 aux cellules endothéliales en participant à la signalisation dans les processus d'angiogénèse (Volk *et al.*, 1999). Dans ces exemples, la fixation simultanée du ligand aux héparanes sulfates et au récepteur fonctionnel a pour conséquence de rapprocher ces deux types de récepteur, ce qui conduit à l'apparition de signaux supplémentaires.

La N-déacétylation/N-sulfatation, l'épimérisation des acides glucuroniques en acides iduroniques et la position différente des 2-, 3-, et 6-O-sulfates sont autant d'éléments qui expliquent pourquoi les héparanes sulfates sont composés d'une myriade de structures différentes capables d'interagir très spécifiquement avec des HBPs (Capila & Linhardt, 2002). Par ailleurs, puisque les HSPG participent dans une grande variété de processus physiologiques, ils représentent une cible potentielle pour le développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique. La détermination des caractéristiques structurales des motifs héparanes sulfates impliqués dans la régulation spécifique des événements cellulaires permettraient la synthèse d'analogues hépariniques possédant des activités biologiques définies. Par exemple, de

nombreuses études ont utilisées l'héparine ou des dérivés de dextrans pour prévenir la coagulation sanguine, favoriser la cicatrisation ou moduler les activités des facteurs de croissance et des héparanases afin de prévenir la croissance tumorale. Dans le cas de la CyPB, plusieurs travaux ont suggéré qu'elle serait impliquée dans diverses pathologies (Tegeder *et al.*, 1997 ; Endrich & Gehring, 1998 ; Jin *et al.*, 2000 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996). Par conséquent, la détermination de la structure fine du motif héparane sulfate impliqué dans la fixation de la CyPB serait très intéressante pour établir une stratégie basée sur la génération de molécules dérivant d'héparine capables de bloquer les effets médiés par la CyPB dans ces pathologies. C'est pourquoi, après avoir visualisé par la technique de retard sur gel l'interaction entre la CyPB et des oligosaccharides d'héparine, nous avons étudié plus spécifiquement les caractéristiques de cette interaction. Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode physique de mesure des paramètres d'interaction basée sur la technologie des biocapteurs optiques de type IAsys.

PARTIE II

**Etude des caractéristiques structurales du motif
héparinique reconnu par la CyPB.
Analyse par la technologie du biocapteur IAsys**

I - INTRODUCTION

A - PRINCIPE

La caractérisation des interactions moléculaires est essentielle à l'analyse des relations structure-fonction des molécules biologiques et à la compréhension des systèmes biologiques modulés par ces interactions. Les biocapteurs optiques sont des outils développés depuis le début des années 1990 qui permettent de mesurer en temps réel les interactions moléculaires en utilisant le principe des ondes évanescentes. Quatre types de biocapteurs commerciaux sont disponibles à ce jour : IAsys (Affinity Sensors), BIOS-1 (Artificial Sensing Instruments), BIAcore (Pharmacia Biosensor) et BioTul (BioTul). Ils diffèrent dans la technologie permettant de générer l'onde évanescente. IAsys et BIOS-1 utilisent le principe de guidage d'onde (*waveguiding*) et de réflexion de résonance (*resonant mirror*) alors que le BIAcore et le BioTul utilisent le principe de résonance plasmonique de surface. Une autre différence majeure entre le BIAcore et le IAsys est la méthode selon laquelle le ligand est amené à la surface de détection. Le principe du IAsys utilise un système à cuvette dans laquelle les phases contenant les molécules étudiées sont en agitation continue, alors que le BIAcore utilise un flux laminaire (Figure 1).

Les biocapteurs fonctionnent comme des détecteurs de masse utilisant des données optiques pour repérer les changements de masse liés à la fixation d'un ou de plusieurs ligand(s) sur un récepteur immobilisé à la surface du détecteur. Un changement de masse à la surface, lié à la fixation d'un ligand sur son récepteur, est alors traduit en signal électrique. Outre leur forte sensibilité, l'utilisation des biocapteurs a l'avantage d'éviter l'utilisation de la radioactivité ou autres marqueurs chimiques qui nécessitent des étapes supplémentaires (Edwards *et al.*, 1995 ; Fernig, 2001). Les biocapteurs peuvent être utilisés pour l'analyse de cinétique d'interactions entre deux partenaires ou plus, pour rechercher des partenaires putatifs de fixation dans des expériences de reconnaissance moléculaire ou encore pour la sélection d'anticorps monoclonal recombinant.

L'ensemble des résultats expérimentaux décrits dans ce chapitre a été obtenu grâce à l'utilisation de la technologie IAsys. Cette technologie nous a permis de déterminer d'une part les paramètres d'affinité entre la CyPB et les différents partenaires testés (héparine, oligosaccharides de différentes longueurs), et d'autre part les principales caractéristiques structurales responsables de l'interaction entre la CyPB et l'héparine.

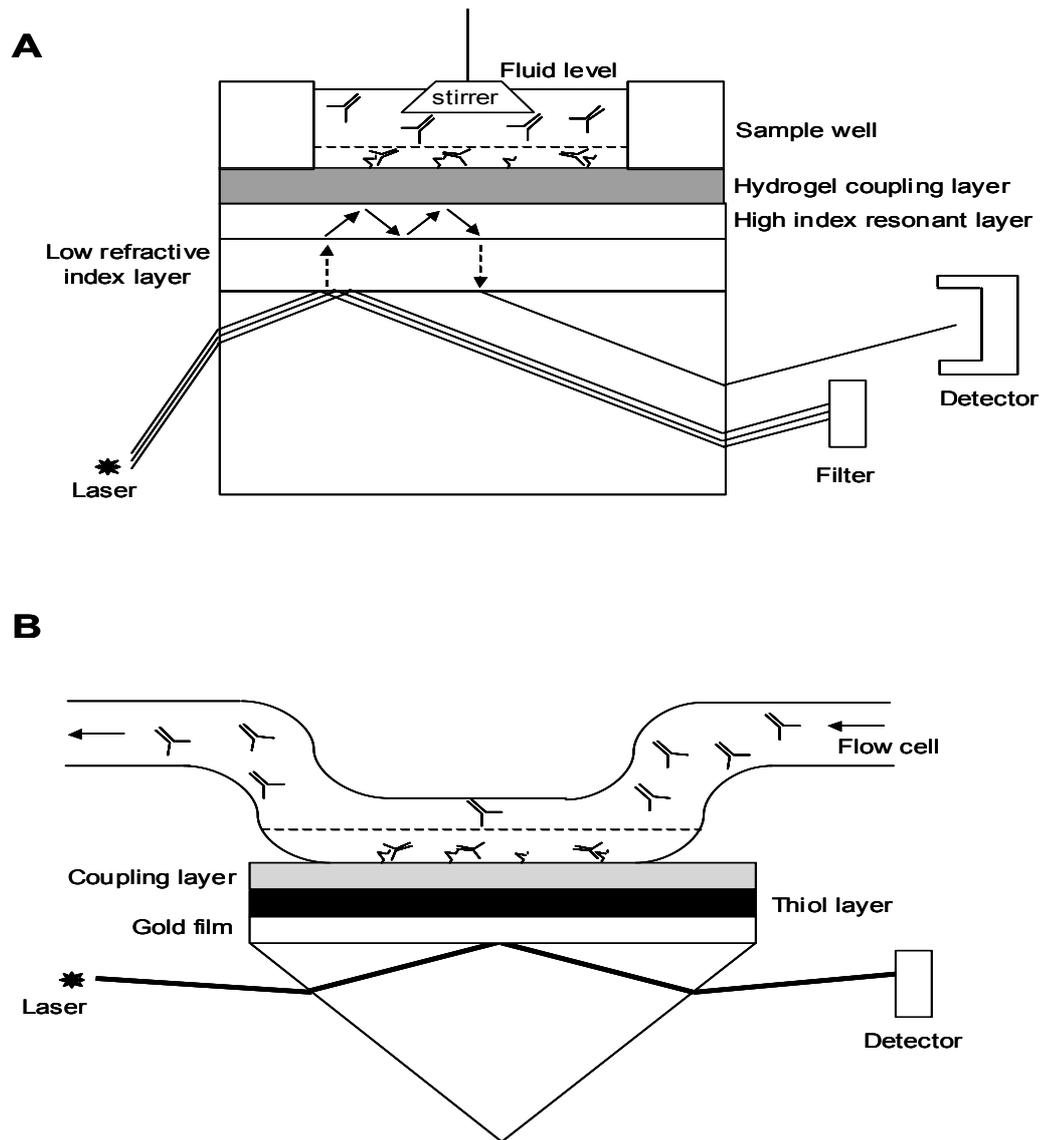


Figure 1 : Principe des biocapteurs optiques de type lasys (A) et Biacore (B)
 (d'après AK Powell, PhD thesis University of Birmingham, 2001)

B - DETERMINATION DES PARAMETRES DE FIXATION

Une des utilisations les plus classiques des biocapteurs optiques est la détermination rapide de cinétiques d'interactions moléculaires (Edwards *et al.*, 1995 ; George *et al.*, 1995 ; Gill *et al.*, 1996). L'association du ligand avec la molécule immobilisée se fait de façon exponentielle avant d'atteindre une phase d'équilibre, où le nombre de ligands s'associant et se dissociant des récepteurs est équivalent. Le remplacement de la phase qui contient le ligand par du tampon est suffisant pour visualiser la dissociation partielle du ligand. Ceci se traduit par une diminution exponentielle du signal. La surface est ensuite régénérée notamment par l'ajout de NaCl 2M pour dissocier les interactions ioniques (Figure 2).

Pour la phase d'association, les équations fournissent deux renseignements. D'une part, elles donnent une valeur du taux de fixation à un temps infini, ce qui traduit en fait le nombre de site maximal ou *extent*. Ce nombre de site est atteint à l'équilibre de fixation, c'est-à-dire quand la courbe d'association a atteint un plateau. D'autre part, elle traduit une constante de fixation observée définie par : $k_{on} = k_{ass}[\text{ligand}] + k_{diss}$ où [ligand] correspond à la concentration du ligand, k_{ass} est la constante d'association et k_{diss} la constante de dissociation. La représentation k_{on} en fonction de [ligand], par conséquent, donne une droite, où les valeurs calculées par le logiciel correspondent aux termes suivants : gradient $\approx k_{ass}$ et intercept $\approx k_{diss}$. Il est toutefois à noter que la valeur de k_{diss} est souvent incorrectement calculée par cette méthode. Il est préférable de calculer k_{diss} directement à partir de la courbe de dissociation en utilisant une régression non-linéaire. Cette courbe de dissociation étant elle-même obtenue par ajout de grosses quantités d'héparine pour détacher le ligand de ses sites de fixation.

La détermination de k_{ass} et k_{diss} permet ensuite le calcul du Kd grâce à l'équation suivante : $Kd = k_{diss} / k_{ass}$ ($Kd_{cinétique}$).

Les réponses mesurées lors de la phase d'association sont directement proportionnelles à la quantité de ligands fixés à la surface (Edwards *et al.*, 1995). Par conséquent, la réponse observée pour le plateau est proportionnelle au taux de fixation du ligand à l'équilibre.

L'analyse du graphe *Extent* en fonction de la [ligand] permet ainsi la détermination de Bmax. Par ailleurs, l'analyse à l'équilibre permet également de calculer le Kd de l'interaction grâce à la régression linéaire du graphe *Extent* en fonction de [ligand] (Schuck & Minton, 1996).

En outre, la valeur de Bmax peut être utilisée pour calculer k_{ass} , *via* l'analyse des constantes initiales (*Slope of initial rate*) (Edwards & Leatherbarrow, 1997).

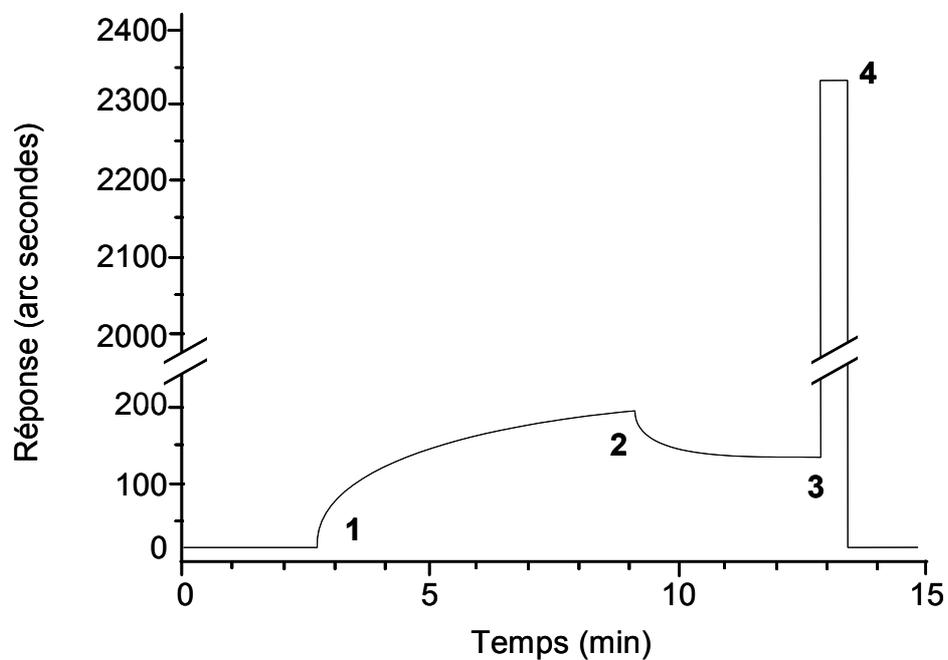


Figure 2 : Représentation de la cinétique de fixation d'une HBP sur héparine. Les différentes phases de la cinétique correspondent à l'association (1), la dissociation (2), la régénération par lavage au NaCl (3) puis le rinçage de la cuvette par du PBST (4).

Le graphe *Slope of initial rate* en fonction de la concentration en ligand donne une droite où le gradient (pente de la courbe) est égal à $k_{ass} \times B_{max}$:

$$\text{Slope of initial rate} = k_{ass} \times B_{max} \times [\text{ligand}]$$

Les valeurs de k_{ass} peuvent par conséquent être calculées grâce à :

$$k_{ass} = \text{gradient}/B_{max}$$

La possibilité d'utiliser des méthodes indépendantes de caractérisation des paramètres cinétiques et du K_d d'une interaction permet d'estimer les artefacts liés à chaque valeur. L'artefact majeur lié à la détermination des cinétiques est la génération d'une fixation biphasique observée à forte concentration en ligand. Cette fixation biphasique, plus apparente sur les longues chaînes d'héparine est la résultante d'au moins deux facteurs (Edwards *et al.*, 1995 ; Schuck, 1997). La première explication est liée au problème dit « du parking ». Dans ce cas, tous les sites de fixation sont équivalents et la fixation doit être considérée comme polymérique. La fixation d'un deuxième ligand nécessite le mouvement du premier le long de la chaîne glycanique, ce qui donne un k_{ass} plus petit pour le ligand 2 et donc une fixation biphasique. La deuxième explication est liée à l'encombrement stérique. Dans ce cas, tous les sites ne sont pas équivalents. De part l'orientation de la chaîne d'héparine à la surface de la cuvette, certains sites sont très accessibles au ligand alors que d'autres le sont beaucoup moins et donc possèdent un k_{ass} plus petit.

Trois précautions sont prises pour éviter ces deux artefacts. D'abord, puisque les oligosaccharides sont biotinylés à leur extrémité réductrice, ils sont orientés en position plutôt verticale à la surface de la cuvette, ce qui a tendance à diminuer les problèmes d'accessibilité de certains sites. Deuxièmement, les concentrations en CyPB utilisées ont été les plus faibles possibles, favorisant ainsi une fixation monophasique. Troisièmement, pour chaque surface utilisée lors du calcul des paramètres cinétiques, on s'assure que le graphe *Slope of initial rate* en fonction de la concentration en CyPB donne une droite, ce qui indique que l'association observée n'est pas due à une diffusion du ligand (Edwards *et al.*, 1997). Pour toutes ces raisons, la réaction de fixation entre la CyPB et les glycanes a été monophasique. Le modèle correspondant à un seul site de fixation a alors pu être utilisé pour calculer tous les paramètres de fixation.

II - RESULTATS

A - CINETIQUE DE FIXATION DE LA CyPB SUR HEPARINE IMMOBILISEE

Dans un premier temps, nous avons analysé la fixation de la CyPB à différentes concentrations sur de l'héparine immobilisée (Figure 3). Les courbes de fixation obtenues sont classiques et comparables à celles obtenues avec d'autres facteurs comme le HGF ou le FGF-2 (Delehedde *et al.*, 2002b ; Delehedde *et al.*, 2002c). Comme ces facteurs, la CyPB se fixe de façon dose-dépendante. Il semble toutefois que l'obtention de réponses d'amplitudes comparables à celles de ces deux facteurs nécessitent des concentrations plus élevées en CyPB, suggérant que la CyPB possède une faible affinité pour l'héparine immobilisée sur la cuvette.

B - INFORMATION SUR LA TAILLE DU MOTIF HEPARINIQUE INTERAGISSANT AVEC LA CyPB

1. Cinétiques de fixation de la CyPB sur héparine et oligosaccharides hépariniques immobilisés.

Les biocapteurs optiques sont fréquemment utilisés pour déterminer la taille minimale nécessaire à l'interaction d'une HBP donnée. Afin de confirmer par une méthode physique les résultats obtenus par visualisation des complexes CyPB/oligosaccharides, nous avons étudié les cinétiques de fixation de la CyPB sur des oligosaccharides de degré de polymérisation 4, 6, 8 et 14. Aucun Kd significatif n'a pu être déterminé pour les cuvettes correspondantes aux tétrasaccharides et hexasaccharides. En revanche, nous avons obtenu des Kd à l'équilibre de $36 \pm 2,5$ nM pour les DP8 et $14,4 \pm 4$ nM pour les DP14. Ces résultats confirment que la taille minimale du motif héparinique capable d'interagir avec la CyPB est un octasaccharide. De plus, les différences d'affinité calculée par cette méthode suggèrent qu'un tétradécasaccharide adopte une conformation plus favorable à la fixation de la CyPB sur la cuvette. En effet, le principe même de fixation des octasaccharides sur la cuvette peut créer des gênes stériques susceptibles de diminuer l'interaction avec les séquences ³KKK⁵ et ¹⁴YFD¹⁶ de la CyPB, séquences préalablement décrites comme délimitant une gouttière à même de recevoir un octasaccharide.

2. Compétition de fixation de la CyPB par des oligosaccharides hépariniques

Dans ces expériences, la fixation de la CyPB sur héparine immobilisée a été analysée en présence d'oligosaccharides allant de DP2 à DP18 (Figure 4). Pour chaque DP, 8 concentrations allant de 0 à 100 µg/ml ont été testées. Quelque soit la concentration utilisée, les DP 2 et DP4 ne modifient pas la fixation de la CyPB sur la cuvette, suggérant que le site de fixation de la CyPB

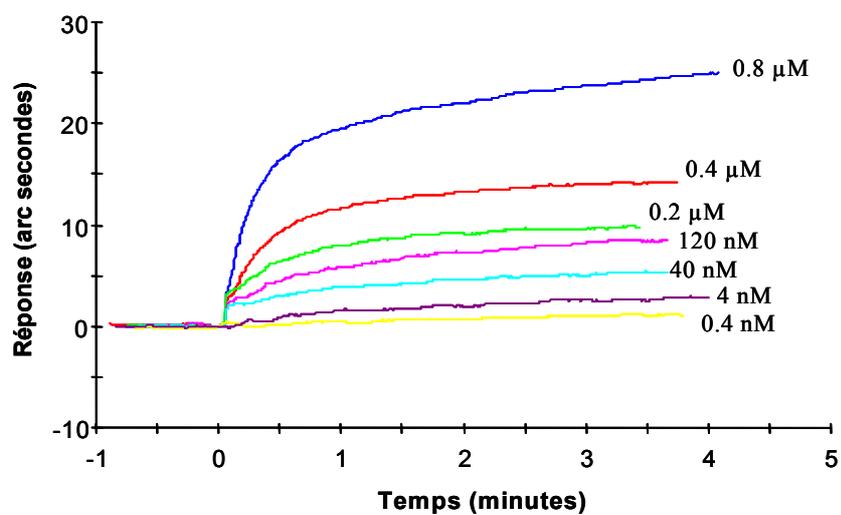


Figure 3 : Cinétiques de fixation de la CyPB sur héparine immobilisée. La fixation sur héparine biotinylée a été suivie pour des concentrations variant de 0,4 nM à 0,8 μM.

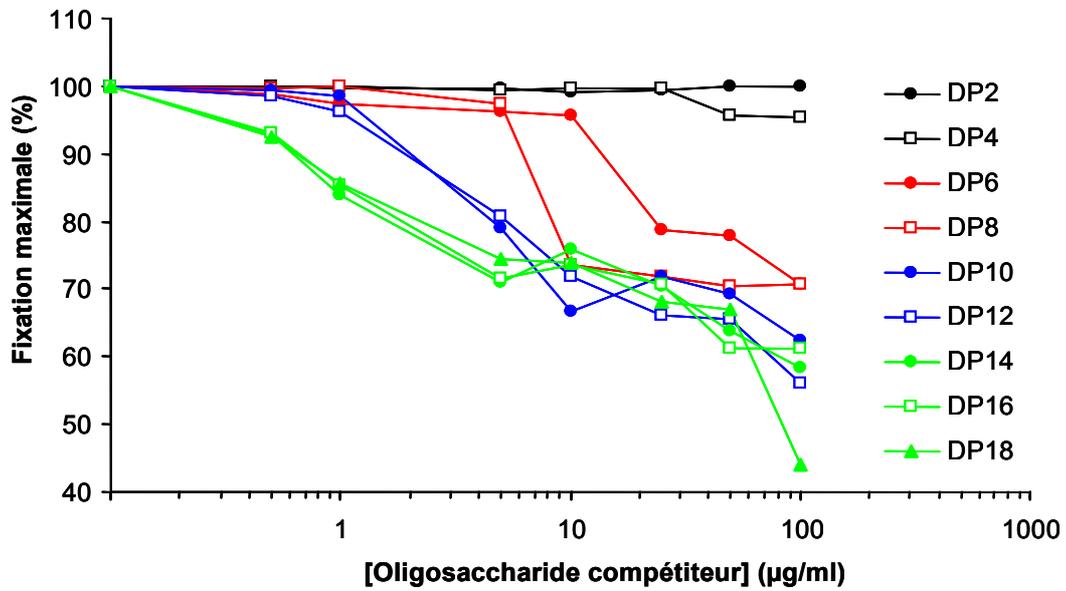


Figure 4 : Compétition de fixation de la CyPB sur héparine immobilisée en présence d'oligosaccharides hépariniques. La fixation de la CyPB sur héparine immobilisée a été mesurée en présence de concentrations croissantes en oligosaccharides de tailles différentes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fixation maximale sur héparine immobilisée, déterminée en absence d'oligosaccharides compétiteurs.

est plus grand qu'un motif tétrasaccharidique. Pour les oligosaccharides de tailles supérieures, la compétition observée est dépendante de la concentration. En effet, la compétition de fixation de la CyPB est significative à partir de 25 µg/ml de DP6, 10 µg/ml de DP8 et 5 µg/ml de DP10 et DP12. Par ailleurs, dès 10 µg/ml, la courbe de compétition des DP8 est superposable aux courbes d'oligosaccharides de taille supérieure. A l'inverse, la courbe de compétition est moins marquée pour les DP6. Il semble donc que le site minimal de fixation de la CyPB soit un octasaccharide. La CyPB peut toutefois se fixer à un hexasaccharide d'héparine, mais avec une faible affinité. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de cinétique de fixation sur les cuvettes des différents DP où un Kd significatif n'a pu être calculé qu'à partir de DP8.

C - ANALYSE DES CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DU MOTIF HEPARINIQUE INTERAGISSANT AVEC LA CYPB

1. Compétition de fixation de la CyPB par des héparines modifiées chimiquement

Pour analyser les caractéristiques structurales du site de fixation de la CyPB, nous avons répété l'expérience précédente en utilisant des héparines modifiées par voie chimique comme compétiteurs (Figure 5). Cinq héparines modifiées ont été utilisées à des concentrations variant de 0 à 100 µg/ml (héparines N-désulfatée, N-désulfatée-réacétylée, N-acétylée, 2-O-désulfatée et 6-O-désulfatée). Une expérience de compétition avec de l'héparine soluble non modifiée a également été réalisée. Cette expérience a servi de témoin positif puisqu'aux fortes concentrations (≥ 10 µg/mL), la compétition observée est totale, suggérant que les quantités de compétiteurs solubles utilisées sont suffisantes pour avoir une inhibition totale. Les héparines N-désulfatée et N-désulfatée-réacétylée ne modifient en aucune manière la fixation de la CyPB sur héparine immobilisée. Les groupements N-sulfates sont donc directement impliqués dans la fixation de la CyPB à l'héparine. En présence de fortes concentrations d'héparines 2-O- ou 6-O-désulfatées, la fixation de la CyPB sur héparine immobilisée est 25 % plus faible que sans compétiteur. Les groupements 2-O- et 6-O-sulfates semblent donc également impliqués dans l'interaction de la CyPB avec l'héparine. Le résultat obtenu avec l'héparine N-acétylée est plus surprenant. En effet, l'addition d'héparine N-acétylée soluble diminue de 50 % la fixation de la CyPB sur héparine immobilisée. La seule modification de cette héparine est l'ajout de groupements acétyls sur les groupements aminés libres de l'héparine.

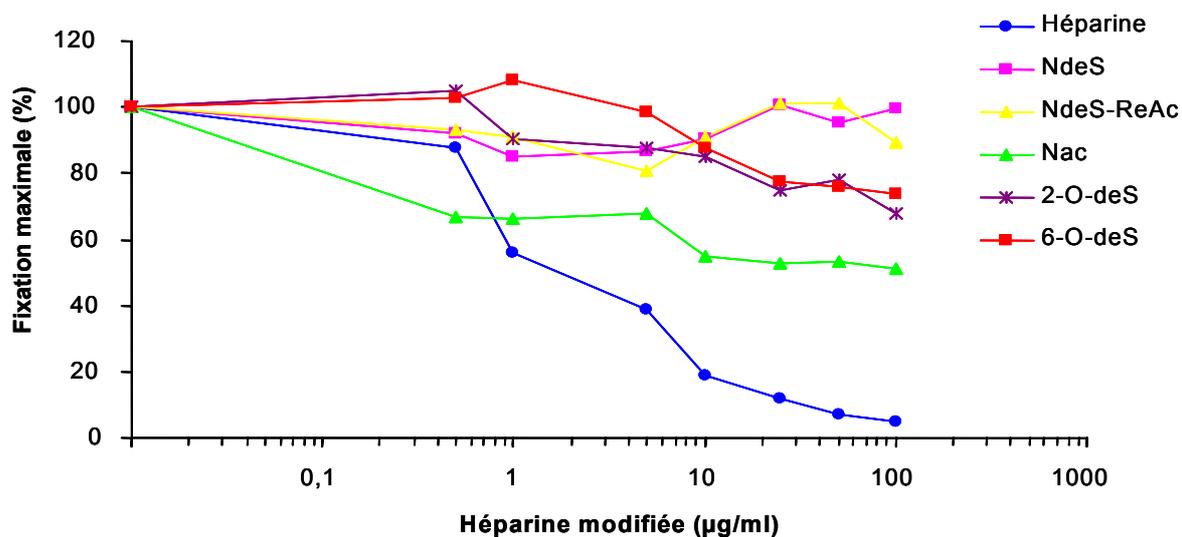


Figure 5 : Compétition de fixation de la CyPB sur héparine immobilisée en présence d'héparines modifiées chimiquement. La fixation de la CyPB sur héparine immobilisée a été mesurée en présence de concentrations croissantes en héparines non modifiée, N-désulfatée (NdeS), N-désulfatée puis réacétylée (NdeS-ReAc), N-acétylée (Nac), 2-O-désulfatée (2-O-deS) ou 6-O-désulfatée (6-O-deS). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fixation maximale à l'héparine, déterminée en absence d'héparines compétitrices.

Cette modification diminue de 50 % le pouvoir compétiteur de l'héparine, suggérant que les groupements NH₂ ou leur environnement proche sont impliqués dans l'interaction de la CyPB avec son site de fixation glycanique.

Par ailleurs, nous avons vérifié la capacité de ces différentes héparines à inhiber la fixation du FGF-2 sur héparine immobilisée. Nous avons retrouvé les résultats décrits dans la littérature à savoir que les groupements N-sulfates et 2-O-sulfates sont impliqués dans l'interaction du FGF-2 avec l'héparine (Gallagher, 1998). Les résultats obtenus avec le FGF-2 permettent donc de valider les modifications chimiques des différentes héparines et par conséquent les résultats obtenus avec la CyPB. De plus, ces résultats suggèrent que la CyPB et le FGF-2 se fixent sur des motifs hépariniques différents.

2. Expériences de *footprinting*

Pour savoir si les sites de fixation de la CyPB et du FGF-2 sur l'héparine possèdent réellement des caractéristiques différentes, nous avons réalisé des expériences de *footprinting* avec ces deux molécules (Figure 6). Si les deux molécules ont des sites communs, le FGF-2 ne se fixera plus sur la cuvette après ajout d'un large excès de CyPB, et réciproquement. Comme attendu, la fixation du FGF-2 est identique avant ou après addition de CyPB, indiquant que la présence de la deuxième HBP ne gêne pas la fixation du FGF-2. Dans l'expérience inverse, la fixation de la CyPB n'est pas modifiée avant et après ajout de FGF-2, confirmant que les deux HBPs reconnaissent des motifs différents. Par ailleurs, il est intéressant de constater qu'aux concentrations utilisées (60 nM pour le FGF-2 et 480 nM pour la CyPB), l'amplitude des réponses observées est très différente. En effet, malgré des poids moléculaires comparables, la CyPB donne une réponse 3 fois plus faible que le FGF-2 à une concentration pourtant 10 fois supérieure. Les sites de fixation de la CyPB sont donc nettement moins représentés que ceux du FGF-2. Puisque les sites de fixation du FGF-2 et de la CyPB sont respectivement des motifs tétrasaccharidiques (Delehedde *et al.*, 2002c) et octasaccharidiques, il n'est pas étonnant de retrouver plus de sites de fixation du FGF-2 sur une cuvette d'héparine immobilisée. Toutefois, cette différence d'intensité de réponse entre les deux molécules pourrait s'expliquer par une plus grande rareté du site de la CyPB. Des résultats similaires, obtenus avec le HGF, confirment d'ailleurs que le motif reconnu par la CyPB est peu commun.

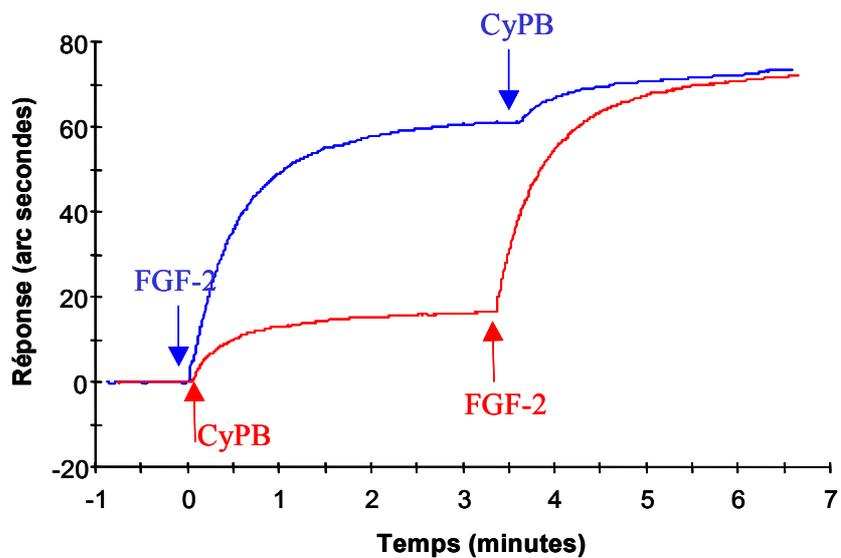


Figure 6 : Expérience de *footprinting* entre la CyPB et le FGF-2. La fixation du FGF-2 sur héparine immobilisée a été analysée après fixation préalable de la CyPB (courbe rouge) et réciproquement (courbe bleue).

3. Mise en évidence de l'implication des groupements aminés libres de l'héparine dans l'interaction avec la CyPB

Pour tester l'implication éventuelle des groupements NH_2 de l'héparine et/ou leur environnement proche dans les interactions avec la CyPB, nous avons réalisé dans un premier temps des expériences de compétition de fixation de CyPB sur héparine immobilisée en présence d'héparine modifiée par le BS^3 (Bis[sulfosuccinimidyl]subérate) (Figure 7). Le BS^3 est un composé bifonctionnel qui bloque les fonctions amines libres de l'héparine. En présence d'héparine non modifiée à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$, on retrouve le résultat obtenu précédemment, à savoir une inhibition totale de la fixation de la CyPB. En revanche, en présence d'héparine modifiée par le BS^3 , une partie de la fixation de la CyPB est restaurée, suggérant que l'héparine- BS^3 est un moins bon compétiteur que l'héparine. Par conséquent, le fait de bloquer les groupements aminés libres de l'héparine diminue sa capacité de compétition.

La biotinylation de l'héparine permet son immobilisation à la surface des cuvettes activées par la streptavidine. Toutes les expériences précédentes ont été réalisées sur une cuvette où la biotine était couplée à l'extrémité réductrice de l'héparine *via* la sérum albumine bovine. Pour confirmer l'éventuelle implication du groupement NH_2 et/ou son environnement dans les interactions avec la CyPB, nous avons réalisé une nouvelle cuvette où l'héparine a été fixée *via* la biotinylation de ses groupements aminés libres internes. Sur cette nouvelle cuvette, seul le FGF-2 se fixe spécifiquement. En effet, à une concentration 30 fois supérieure au FGF-2, la fixation de la CyPB sur cette cuvette est équivalente à la fixation non spécifique de la CyPB sur une cuvette streptavidine seule (Figure 8).

L'ensemble de ces résultats indique que la CyPB ne se fixe pas à l'héparine dont l'environnement des groupements aminés libres est inaccessible (Figure 8). Les groupements aminés de l'héparine sont très majoritairement substitués. L'utilisation de concentrations élevées en CyPB dans l'expérience d'effet-dose ne serait donc pas liée à une faible affinité de la CyPB pour l'héparine, mais bien à la rareté de son site de fixation.

III - DISCUSSION

Les expériences de fixation directe sur des cuvettes d'oligosaccharides de taille différente ou l'utilisation de ces mêmes oligosaccharides dans des expériences de compétition de fixation nous ont permis de montrer que la taille minimale du motif héparinique capable d'interagir avec la CyPB est un octasaccharide. Ces résultats confirment ceux obtenus préalablement par les expériences de gel retard en condition non dénaturante.

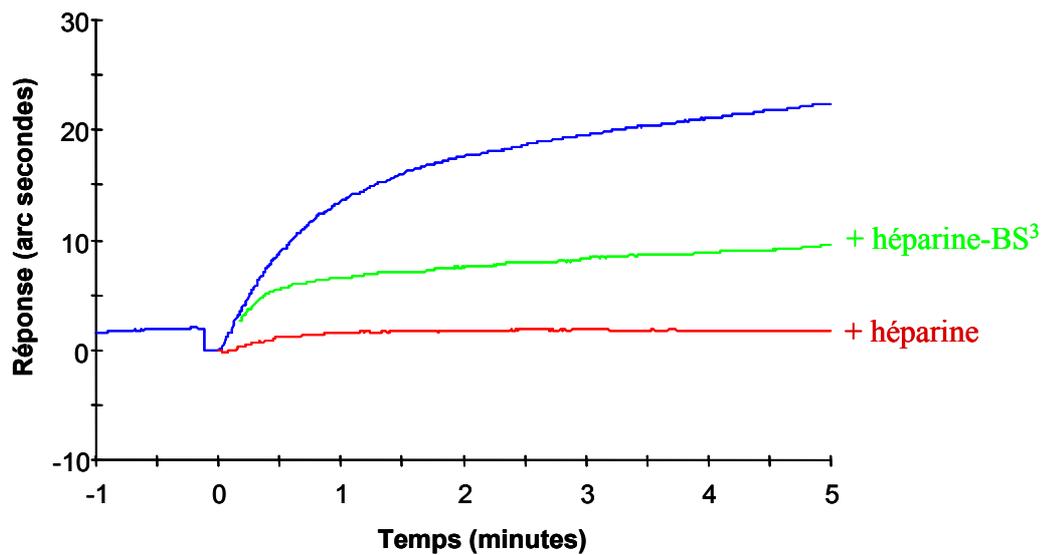


Figure 7 : Compétition de fixation de la CyPB sur héparine immobilisée en présence d'héparine non modifiée ou modifiée par le BS³. Les cinétiques de fixation ont été réalisées en absence (courbe bleue), ou en présence de 50 µg/ml d'héparine modifiée (courbe verte) ou non (courbe rouge).

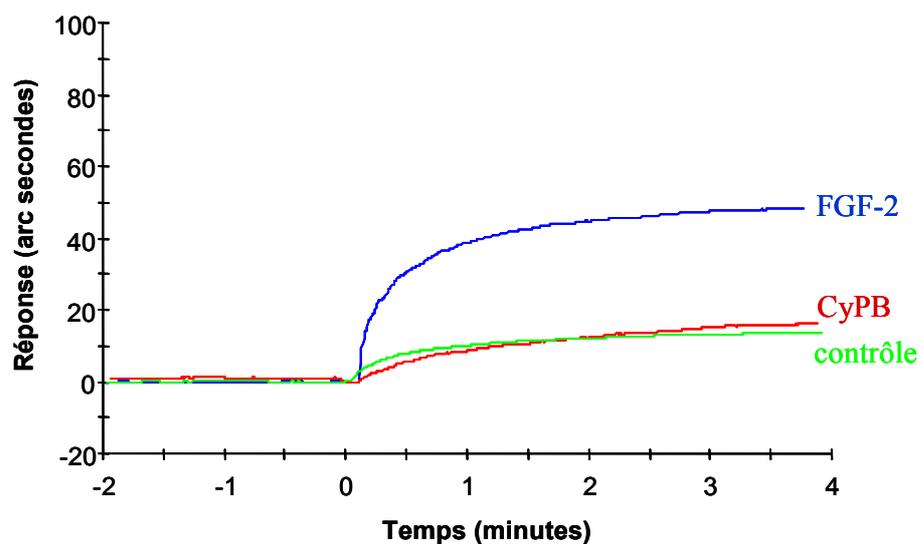


Figure 8 : Fixation de la CyPB et du FGF-2 sur héparine immobilisée via la biotinylation de ses groupements aminés internes. La fixation de la CyPB (courbe rouge) et du FGF-2 (courbe bleue) a été analysée sur une cuvette streptavidine sur laquelle l'héparine a été fixée via la biotinylation de ses groupements aminés internes. Le contrôle (courbe verte) correspond à la fixation non spécifique de la CyPB sur la cuvette streptavidine.

L'étude des caractéristiques structurales du motif reconnu par la CyPB a été étudiée ensuite par des expériences de compétition de fixation de la CyPB sur héparine en présence d'héparines modifiées chimiquement. Il est alors apparu que les groupements N-sulfates sont absolus nécessaires à l'interaction et, dans une moindre mesure, les groupements 2- et 6-O-sulfates. Mettre en évidence une telle implication des groupements sulfates de l'héparine dans les interactions avec la CyPB n'est pas surprenant. En effet, toutes les interactions héparine/HBPs reposent en partie, voire totalement sur des interactions ioniques. Ces interactions ont même permis de définir des séquences consensus protéiques composées exclusivement de résidus d'acides aminés basiques (Cardin & Weintraub, 1989).

Des expériences de compétition entre la CyPB et deux autres HBPs, le FGF-2 et le HGF, ont montré que la CyPB reconnaît un motif de fixation héparinique différent de ces deux facteurs. En effet, dans nos essais, la CyPB se fixe librement et sans compétition à l'héparine en présence de FGF-2 ou de HGF. De même, la fixation d'un des deux facteurs de croissance à l'héparine avant ou après addition d'un large excès de CyPB est la même, suggérant que la CyPB requiert la participation d'un groupement supplémentaire qui n'est pas nécessaire à la fixation du FGF-2 ou du HGF à l'héparine. Les sites de fixation de ces deux facteurs sont connus et sont composés majoritairement d'unités disaccharidiques [IdoA(2-SO₃)-GlcNS-O3(6-SO₃)] (Ashikari *et al.*, 1995 ; Pye *et al.*, 1998). Nous avons alors cherché si un motif particulier de l'héparine était responsable de la fixation de la CyPB et expliquerait à lui seul les différences de spécificité de fixation. Les expériences de compétition avec l'héparine N-acétylée ou modifiée par le BS³ ont suggéré que les groupements NH₂, ou leur environnement proche, sont responsables de la spécificité de fixation de la CyPB. Par conséquent, nous avons réalisé une nouvelle cuvette où nous avons fixé l'héparine, non plus par son extrémité réductrice, mais *via* ses groupements aminés internes. Aucune fixation de la CyPB n'a été constatée sur cette cuvette. A l'inverse, la fixation du FGF-2 est conservée. Ces données confirment que les groupements aminés libres et/ou leur environnement proche sont impliqués dans la spécificité d'interaction entre la CyPB et ses motifs hépariniques.

Plus de 85 % des glucosamines de l'héparine sont N-sulfatées (Lyon & Gallagher, 1998). Par conséquent, la nécessité d'une glucosamine libre explique pourquoi le site de fixation de la CyPB est rare. En effet, nous avons montré qu'à une concentration 10 fois supérieure au FGF-2, la CyPB donne une réponse trois fois inférieure. L'implication d'une glucosamine libre dans la fixation de HBPs est une chose peu commune. La présence de fonctions amines libres dans le motif héparinique reconnu par une HBP n'a effectivement été décrite que pour la L-sélectine (Norgard-Sumnicht & Varki, 1995) et pour la glycoprotéine gD de l'enveloppe du HSV (Shukla

et al., 1999 ; Liu *et al.*, 2002). Toutefois, aucun rôle n'a encore été attribué à la présence d'une fonction NH₂ dans le motif reconnu par ces deux HBPs. Dans le cas de la CyPB, l'implication d'un tel groupement pourrait être directe ou indirecte :

- De façon directe, la fonction amine libre pourrait interagir avec la séquence ¹⁴YFD¹⁶ de la CyPB *via* la formation de ponts hydrogènes. Cette interaction permettrait de délimiter une gouttière dans laquelle des motifs d'une taille minimum correspondant à un octasaccharide pourrait se loger.

- De façon indirecte, l'absence de substitution de la fonction NH₂ pourrait favoriser l'interaction de la CyPB avec un groupement situé dans son environnement proche, comme par exemple un groupement 3-O-sulfate localisé sur la même glucosamine. En outre, la fonction amine pourrait être plus impliquée encore en constituant un signal de reconnaissance pour une enzyme capable de brancher un groupement particulier sur l'héparine. Un tel phénomène a été décrit pour la 3-OST-3A (Liu *et al.*, 1999), isoforme qui branche un 3-O-sulfate sur l'hydroxyle du carbone 3 des glucosamines possédant une fonction amine libre. Là encore, l'hypothèse d'un rôle indirect de la fonction amine libre est compatible avec la faible fixation de la CyPB observée sur les cuvettes héparines, puisqu'une glucosamine possédant un groupement 3-O-sulfate et une fonction amine non substituée est très rare dans l'héparine.

En conclusion, qu'elle intervienne directement ou pas, les expériences réalisées en utilisant le Biocapteur optique de type IAsys nous ont permis de montrer que la présence d'une fonction amine libre dans le motif de fixation héparinique reconnu par la CyPB est absolument nécessaire. Ces résultats supportent par ailleurs l'hypothèse d'une spécificité de reconnaissance très étroite entre les chaînes héparanes sulfates et la CyPB. Afin de conclure sur le rôle de la fonction amine libre, il est maintenant nécessaire de séquencer le motif héparane sulfate reconnu par la CyPB et présent sur ses cellules cibles. Toutefois, même si de plus en plus de méthodes de séquençage se sont développées ces dernières années (Turnbull *et al.*, 1999 ; Venkataraman *et al.*, 1999 ; Vives *et al.*, 1999 ; Shriver *et al.*, 2000 ; Rabenstein, 2002), la détermination fine d'une structure héparane sulfate reconnaissant une HBP donnée se heurte le plus souvent à la difficulté d'obtenir des oligosaccharides purifiés en qualité et en quantité suffisantes pour leur analyse structurale.

IV - MATERIELS ET METHODES

1. Biotinylation de l'héparine et des oligosaccharides dérivés d'héparine

Les oligosaccharides utilisés (DP4 à DP14) ont été fournis par Iduron (Manchester, U.K.). Ils ont été préparés par digestion partielle d'héparine de porc par de l'héparinase I. L'unité disaccharidique principale de ces oligosaccharides (>75 %) est IdoA,2S-GlcNSO₃,6S.

La biotinylation des oligosaccharides (1mg/ml dans du PBS) à l'extrémité réductrice a été réalisée par ajout de 5 mM final de biotine-XX-hydrazide (Pierce). Les échantillons sont ensuite mis sous agitation pendant 2 heures à température ambiante, puis purifiés par deux méthodes différentes :

- les oligosaccharides dont la taille est supérieure à DP10 sont retenus sur une colonne de DEAE Séphacel (Pharmacia) équilibrée dans du tampon NaCl 50 mM, Na₂PO₄ 10 mM, pH 7,0. Après lavages avec la même solution pour éliminer l'excès de biotine qui n'a pas réagi, les oligosaccharides fixés sont élués avec 1 ml de NaCl 1,5M.

- les oligosaccharides de DP4 à DP8 sont injectés sur une colonne HPLC échangeuse d'anion Hypersil (250 mm x 4,6 mm, pore 5 µm ; ThermoQuest, Runcorn, Cheshire, U.K.) reliée à un détecteur UV à 232 nm. La colonne est ensuite lavée avec de l'eau puis avec du NaCl 0,1 M pour enlever la biotine qui n'a pas réagi. Les oligosaccharides fixés sur la colonne sont ensuite élués par du NaCl. Le succès de la biotinylation des oligosaccharides a été confirmé par dot-blot.

La biotinylation interne de l'héparine intestinale de porc ou de poumon de bœuf a été réalisée selon la méthode adaptée de Lee & Conrad (1984). L'héparine est incubée avec 3 excès molaires de sulpho-NHS(LC)- biotine (Pierce) dans une solution de NaCO₃ (pH 8,6). La réaction est stoppée par gel filtration dans un tampon 0,1 M NH₄HCO₃ pour éviter l'aggrégation de la biotine non conjuguée à faible pH. L'héparine-BSA-biotine utilisée est commercialisée par Sigma.

2. Réalisation des cuvettes

Les surfaces de détection constituent un point crucial qui permet l'étude de la fixation d'un large spectre de ligands. Elles permettent la détection de petites molécules comme des protéines, des acides nucléiques, des sucres ou encore des structures biologiques comme des membranes ou des bactériophages (Lowe *et al.*, 1998). Les surfaces disponibles incluent des dextrans carboxyméthylés ou des surfaces planes dérivées avec des groupements aminés, carboxylates ou biotinylés.

Le système de capture biotine-streptavidine est une méthode privilégiée pour l'immobilisation de ligands tels que les protéoglycannes ou les dérivés polysaccharidiques (Figure 9). Il évite d'une part les problèmes de pénétration de ces ligands dans les gels de dextran carboxyméthylés. D'autre part, ce système favorise l'orientation des protéoglycannes et des polysaccharides biotinylés, ce qui optimise la fixation du ligand (Fernig, 2001).

La streptavidine est couplée aux groupements aminés des cuvettes selon le protocole fourni par le constructeur (Affinity Sensors). Dans un premier temps, la surface aminosilane des cuvettes neuves est lavée par HCl 20 mM, puis équilibrée dans du tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7,7. Les groupements aminés sont ensuite activés par du BS³ (1mM dans du tampon phosphate). Le BS³ est un composé bifonctionnel qui permet la liaison entre les groupements aminosilanes de la cuvette et les groupements aminés de la streptavidine. Après rinçage, 50 µg de streptavidine sont ajoutés. L'immobilisation est réalisée pendant 30 à 40 minutes et estimée par mesure du *bulk shift*, qui doit avoir une amplitude d'environ 1000 ArcS. Les groupements BS³ qui n'ont pas réagi sont bloqués par une solution de Tris 3 M, pH 8. La cuvette est ensuite rincée plusieurs fois avec du tampon phosphate, puis avec du PBS Tween 0,02 % (PBST).

L'héparine biotinylée sur ses groupements aminés est immobilisée comme décrit par Kinsella *et al.* (1998). Un deuxième type de cuvette d'héparine immobilisée est réalisé en ajoutant 2 µg d'héparine-BSA-biotine. Finalement, les cuvettes contenant les oligosaccharides de DP différents sont préparées selon la méthode décrite par Delehedde *et al.* (2002b). L'intégrité de la cuvette a été testée en visualisant le scan de résonance lors de la phase d'association de la réaction de fixation d'un ligand (FGF-2). Cette méthode permet de vérifier que le ligand est distribué de façon uniforme à la surface de la cuvette et, par conséquent qu'il n'y a pas eu de micro-aggrégation.

3. Mesure des cinétiques de fixation

Les mesures ont été réalisées sur l'appareil robotisé IAsis Auto+. Un essai de fixation est réalisé par addition de 5 µl d'une solution de CyPB à une concentration donnée dans une cuvette contenant 45 µl de PBST. La réaction de fixation est alors suivie pendant 210 secondes. La cuvette est ensuite lavée trois fois avec 50 µl de PBST puis régénérée par deux lavages avec un tampon NaCl 2 M/Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,2. Une simple expérience permet d'obtenir quatre paramètres de fixation : le *Slope of initial rate* de l'association, la constante d'association k_{ass} et l'*extent* de fixation, tous calculés à partir de la phase d'association, et la constante de dissociation, calculée à partir de la phase de dissociation.

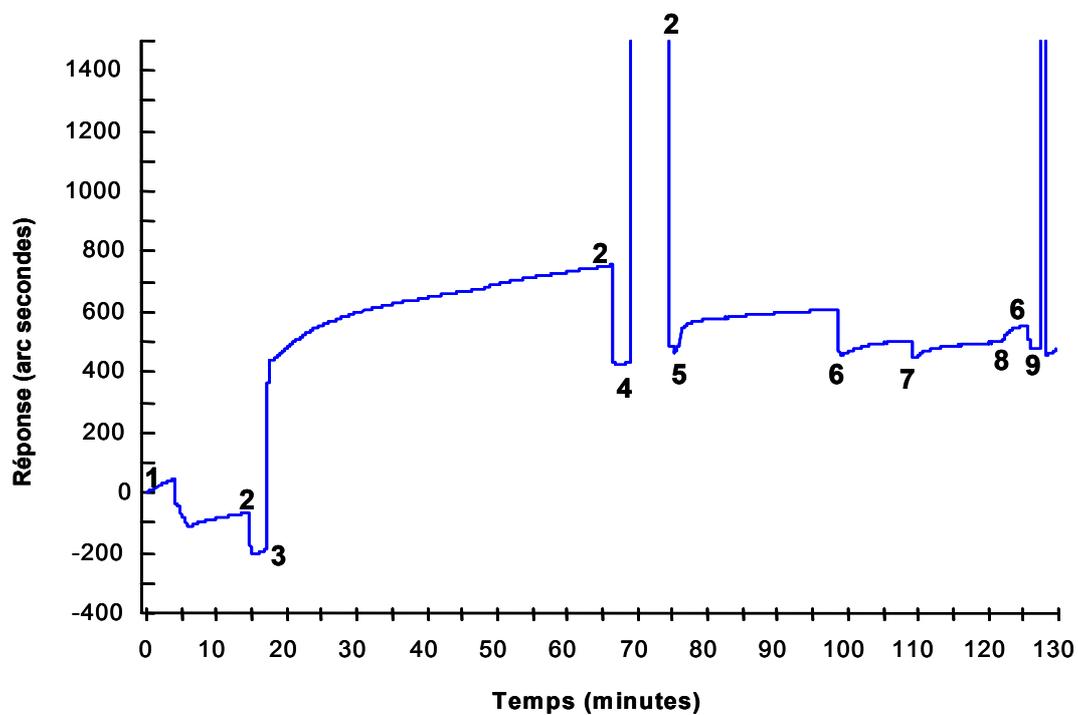


Figure 9 : Protocole d'immobilisation de l'héparine-BSA-biotine sur cuvette aminosilane activée par la streptavidine. 1. Addition de BS³ - 2. Tampon Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.7 - 3. Streptavidine (50 µg) - 4. Tris 3 M; pH 8 - 5. Addition d'héparine-BSA-biotine (2 ug) - 6. PBS Tween 0.02 % (w:v) (PBST) - 7. PBST (25 µl) - 8. CyPB 5 µl à 50 µg/ml - 9. NaCl 2 M

4. Analyse des paramètres de fixation

Les paramètres de fixation ont été calculés grâce aux phases d'association des réactions de fixation en utilisant le logiciel adapté FastFit (Affinity Sensors) fourni avec l'appareil. La fixation maximale (Bmax) ainsi que la constante de dissociation à l'équilibre (Kd) ont été calculées grâce au graphe *extent* en fonction de la concentration en CyPB.

5. Expériences de compétition de fixation

Les expériences de compétition avec les différents oligosaccharides ou les héparines modifiées ont été réalisées sur la surface aminosilane dérivée avec de l'héparine biotinylée *via* de la BSA. Les DP2 à DP18 ont été fournis par Iduron (Manchester, U.K.) et les héparines modifiées (N-désulfatée, N-désulfatée-réacétylée, N-acétylée, 2-O-désulfatée et 6-O-désulfatée) par le Dr. M. Lyon (University of Manchester, U.K.). L'héparine modifiée par le BS³ a été obtenue par incubation avec le composé bifonctionnel pendant 4 heures puis la réaction a été bloquée avec du TRIS 3M. La cuvette a été équilibrée dans 40 µl de PBST puis 5 µl d'une solution diluée d'oligosaccharides ou d'héparines modifiées sont ajoutés dans la cuvette suivi de l'ajout de 5 µl de CyPB à 50 µg/ml pour initier la fixation. La réaction de fixation a lieu pendant 5 minutes. La cuvette est lavée 3 fois avec 50 µl de PBST puis est régénérée avec du NaCl 2 M. Les solutions sont stockées à 4°C dans un compartiment de l'appareil pour toute la durée de l'expérience. La capacité de fixation de l'héparine immobilisée à la surface de la cuvette reste identique lors de toute la durée de l'expérience puisqu'aucun changement de fixation de la CyPB n'a été détecté en absence de compétiteurs au début et à la fin de l'expérience. L'*extent* de la fixation a été calculé en associant la courbe d'association au modèle un site et en utilisant le logiciel FastFit. Les résultats ont ensuite été présentés en pourcentage de fixation maximale en fonction de la concentration en oligosaccharides ou en héparines modifiées.

Conclusion

Depuis la découverte de la CyPA comme récepteur cytosolique de la CsA (Handschumacher *et al.*, 1984), les études sur les cyclophilines ont pris un essor considérable. Ces travaux ont non seulement permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité immunosuppressive de la CsA (Schreiber, 1991 ; Galat, 1999), mais ils ont également permis de mettre en évidence l'implication des cyclophilines dans de nombreux processus biologiques (Galat, 1999 ; Bukrinsky, 2002). Bien que ces protéines soient capables de catalyser *in vitro* l'isomérisation *cis-trans* de la liaison Xaa-Pro, leur rôle dans la mise en conformation des protéines n'a pas clairement été démontré *in vivo* (Fischer *et al.*, 1998).

Chez l'Homme, seules les CyPA et CyPB ont été caractérisées dans les liquides biologiques (Allain *et al.*, 1995 ; Jin *et al.*, 2000 ; Liao *et al.*, 2000). La CyPA a une activité chimiotactile pour les granulocytes et les monocytes (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992) et induit la génération de flux calciques dans les lymphocytes (Sherry *et al.*, 1998). De plus, l'expression et la sécrétion de la CyPA sont augmentées en réponse à des stimuli inflammatoires (Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; Jin *et al.*, 2000 ; Liao *et al.*, 2000). D'abord décrite comme une protéine résidente du réticulum endoplasmique, la CyPB a, quant à elle, été caractérisée dans les milieux de sécrétion tels que le lait et le plasma (Spik *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995). En se basant sur la démonstration que les cyclophilines sécrétées induisent des réponses cellulaires *in vitro*, Bukrinsky (2002) a défini ces protéines comme des médiateurs inattendus dans la communication intercellulaire.

Récemment, le CD147 a été identifié comme une molécule de signalisation essentielle à l'activité des cyclophilines extracellulaires (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002). En analysant les réponses induites par la CyPB chez les lymphocytes T et les HL-60/neutrophiles, nous avons montré que les activités communes des CyPA et CyPB sont dépendantes de la fixation sur un même récepteur, et confirmé l'implication du CD147 dans l'activité pro-adhésive de la CyPB. Par ailleurs, des expériences de désensibilisation ont suggéré que le CD147 serait une sous-unité du récepteur des cyclophilines, qui interviendrait dans la transduction de signaux induits par la fixation de ces facteurs. Ce modèle pourrait expliquer les activités communes des deux cyclophilines malgré les différences d'affinité pour le même récepteur. En effet, la CyPA est moins efficace que la CyPB pour induire un flux calcique et une réponse chimiotactile. De plus, ni la CyPA, ni le mutant CyPB_{KKK} ne sont capables d'induire l'adhésion à la matrice extracellulaire. Ces données suggèrent que la fixation sur le récepteur de type I et l'activation des voies couplées au CD147 sont nécessaires pour induire des signaux intracellulaires mais insuffisantes pour obtenir une réponse telle que l'adhésion cellulaire par activation des intégrines. La différence majeure entre les deux cyclophilines est la présence dans la CyPB d'un

peptide N-terminal spécifique, capable de créer des interactions fortes avec des chaînes héparanes sulfates (sites de type II). Par conséquent, ces interactions semblent être à la base de la spécificité d'action de la CyPB. Les HSPG pourraient intervenir dans les réponses cellulaires induites par la CyPB, (i) en créant des interactions spécifiques par l'intermédiaire de leurs chaînes glycosidiques, (ii) en participant dans les effets induits par la fixation de la CyPB sur ces cellules cibles, soit en qualité de molécules présentatrices, soit en intervenant directement dans la génération de signaux intracellulaires.

Afin de déterminer la nature et l'implication des HSPG dans l'activité pro-adhésive de la CyPB, nous avons utilisé la lignée pro-myélocytaire HL-60. Les propriétés des sites de fixation présents à la surface des HL-60 différenciées en neutrophiles sont équivalentes à celles des lymphocytes T, faisant de ces cellules un modèle de choix pour étudier la régulation d'expression des sites de type II. Pour mieux appréhender le rôle des HSPG dans l'activité de la CyPB, nous avons d'abord déterminé la nature des protéoglycannes exprimés à la surface des cellules sensibles à la CyPB. Ces travaux ont été réalisés par des analyses en RT-PCR, qui ont permis de suivre l'apparition des transcrits codant pour les différents cores protéiques et, par cytofluorimétrie en flux.

Ainsi, nous avons montré que la différenciation des cellules HL-60, cellules insensibles à la CyPB, en HL-60/neutrophiles, s'accompagne de la surexpression des syndécan-1 et -2. Ce phénomène est concomitant à l'apparition des sites de fixation de type II et à l'augmentation d'adhésion des cellules sur la fibronectine, suggérant que les syndécan-1 et -2 interviennent dans l'activité pro-adhésive de la CyPB. Concernant les lymphocytes T du sang, nos résultats suggèrent que la participation moindre du syndécan-1 soit liée à la plus faible expression de cet HSPG sur les lymphocytes T.

L'addition d'héparine après digestion des héparanes sulfates membranaires par l'héparinase I ne restaure ni l'adhésion des lymphocytes T, ni celle des HL-60/neutrophiles. Ces données suggèrent que les syndécan-1 et -2 agissent comme des co-récepteurs pour la CyPB en fixant le ligand sur leurs chaînes héparanes sulfates mais surtout en favorisant l'émergence de signaux intracellulaires *via* leur partie cytoplasmique. La description du rôle des syndécans en tant que co-récepteurs de facteurs biologiques extracellulaires n'est pas nouvelle et a été démontré pour chaque membre de cette famille de HSPG (Kinnunen *et al.*, 1998a ; Modrowski *et al.*, 2000 ; Simons & Horowitz, 2001 ; Derksen *et al.*, 2002). En effet, tous les syndécans possèdent un motif cytoplasmique conservé capable de fixer des molécules de signalisation et du cytosquelette (Rapraeger, 2000 ; Woods & Couchman, 2001). La CyPB serait donc un nouvel exemple de facteur pour qui les syndécans seraient à la fois impliqués dans la fixation spécifique

et la modulation de ses réponses cellulaires. Des expériences complémentaires d'invalidation d'expression, applicables au modèle HL-60, devraient par ailleurs permettre de confirmer le rôle de ces deux HSPG dans l'activité pro-adhésive de la CyPB. Ce modèle permettra également l'étude des signaux intracellulaires associés à la fixation de la CyPB sur son récepteur d'une part, et sur les sites de type II d'autre part. Ceci devrait permettre d'élucider la participation active des HSPG dans l'activité pro-adhésive de ce facteur.

Nous avons démontré que les cellules HL-60 non différenciées possèdent le site de type I et les syndécan-1 et -2 sans toutefois être capables d'adhérer à la fibronectine. En outre, les cellules HL-60 non différenciées ou différenciées en éosinophiles n'expriment pas les motifs héparanes sulfates reconnus par la CyPB. La différenciation en HL-60/neutrophiles conduit donc à l'apparition de motifs héparanes sulfates spécifiquement impliqués dans la fixation de la CyPB. L'apparition de ces motifs est la résultante d'une régulation fine des enzymes de biosynthèse des chaînes héparanes sulfates. Dans ce contexte, le modèle HL-60 semble également adapté à la détermination des caractéristiques structurales des motifs héparanes sulfates reconnus par la CyPB, ainsi qu'à l'analyse de la régulation de la machinerie enzymatique responsable de l'apparition de ces motifs sur les cellules cibles. Ces données permettront de mieux comprendre la régulation de l'activité de la CyPB puisque c'est l'état de la machinerie de biosynthèse des héparanes sulfates qui régule la réponse des cellules à des ligands extracellulaires bien définis (Park *et al.*, 2000).

Les protéoglycannes sont sujets à de nombreuses modifications structurales au cours de l'activation des cellules et peuvent n'apparaître que pendant une phase bien précise de l'inflammation. L'identification des motifs GAGs reconnus par une protéine inflammatoire, comme la CyPB, est un enjeu important car elle peut aider à la compréhension de la spécificité de fixation de ce facteur sur ses cellules cibles. C'est pourquoi, la seconde partie de mes travaux de thèse a consisté à caractériser par une approche plus structurale, le motif glycanique reconnu par la CyPB. Les structures détaillées des héparanes sulfates interagissant avec une HBP donnée n'ont été identifiées que dans de très rares cas (Capila & Linhardt, 2002). Le premier exemple de l'identification précise d'un motif héparinique est la découverte de la séquence d'interaction avec l'antithrombine III, où la caractéristique la plus marquante est la présence d'un groupement 3-O-sulfate porté par une glucosamine N- et 6-O-sulfatée (Lindahl *et al.*, 1980 ; Casu *et al.*, 1981 ; Jin *et al.*, 1997 ; Lindahl *et al.*, 1998 ; Petitou *et al.*, 2003).

Une des difficultés majeures dans l'étude des interactions HBP/héparanes sulfates est liée à la faible expression des protéoglycannes présents sur les cellules cibles. Des travaux antérieurs réalisés dans notre Laboratoire ont montré que l'héparine et les sites de types II présents sur les

lymphocytes T possèdent les mêmes capacités d'interaction avec la CyPB (Denys *et al.*, 1998b). Par ailleurs, il est bien établi que la structure de l'héparine est similaire aux régions fortement sulfatées des héparanes sulfates (Capila & Linhardt, 2002 ; Rabenstein, 2002). Par conséquent, et pour des raisons de disponibilité commerciale, nous avons utilisé l'héparine dans les études structurales du motif reconnu par la CyPB. Deux méthodes distinctes ont été utilisées pour analyser les interactions entre la CyPB et son motif héparinique. Nous avons utilisé d'une part une méthode de retard sur gel en condition non dénaturante qui permet de visualiser les complexes entre la CyPB et un oligosaccharide donné. D'autre part, nous avons utilisé une méthode physique basée sur l'utilisation des biocapteurs optiques de type IAsys, ce qui a fait l'objet d'une collaboration avec le Laboratoire du Dr. D. Fernig (Université de Liverpool, U.K).

L'utilisation de ces deux méthodes nous a permis de montrer que la taille minimale permettant une interaction spécifique avec la CyPB est un octasaccharide. En revanche, aucun complexe n'a été visualisé entre ces mêmes octasaccharides et les deux mutants CyPB_{KKK}- et CyPB_{ΔYFD}, confirmant l'implication des deux séquences ³KKK⁵ et ¹⁴YFD¹⁶ dans la fixation aux motifs hépariniques. Par modélisation moléculaire, nous avons même constaté que ces deux séquences délimitaient en fait une gouttière capable d'accueillir un octasaccharide.

Nous avons ensuite utilisé la technologie du biocapteur pour définir plus spécifiquement l'implication de certains groupements dans les interactions avec la CyPB. L'utilisation d'héparines N-, 2-O- ou 6-O-désulfatées a permis de confirmer l'importance des charges apportées par les sulfates dans les interactions de type HBP/héparine. En revanche et de façon plus surprenante, nous avons mis en évidence l'implication des fonctions amines non substituées et/ou de leur environnement proche. A ce jour, seules la L-sélectine et la protéine gD de l'enveloppe du virus HSV ont été décrites comme interagissant avec un motif héparinique qui possède entre autres une fonction NH₂ libre (Norgard-Sumnicht & Varki, 1995 ; Shukla *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2002). Toutefois, l'absolue nécessité de cette fonction amine dans l'interaction avec ces deux HBPs n'a pas clairement été établie. Dans le cas de la CyPB, la nécessité d'une glucosamine libre est en accord avec les faibles signaux observés malgré l'utilisation de concentrations plus élevées que celles utilisées pour d'autres facteurs comme le FGF-2 ou l'HGF. Ces faibles réponses seraient directement liées à la rareté des fonctions amines libres dans les chaînes d'héparine. En effet, le pourcentage de fonction amine libre varie de 0,7 à 4 % selon la provenance des chaînes héparine/héparanes sulfates (Westling & Lindahl, 2002). En conclusion, la séquence héparane sulfate capable de fixer la CyPB porte au minimum des groupements 2, 6 et N-sulfate ainsi qu'une glucosamine libre. La position et le nombre de ces groupements reste toutefois à déterminer.

La caractérisation des interactions fines entre la CyPB et ses motifs héparanes sulfates pourrait conduire à l'élaboration de nouvelles thérapies biologiques reposant sur l'utilisation d'analogues glycaniques comme cela a déjà été décrit pour l'antithrombine III (Petitou *et al.*, 1999). Des dérivés de l'héparine, sans pouvoir anti-coagulant, et copiant les motifs héparanes sulfates reconnus par la CyPB, pourraient servir d'antagonistes de fixation sur les protéoglycannes et priver ainsi les cellules d'une partie de leurs voies d'activation. Ces glycanes antagonistes pourraient avoir des applications dans diverses pathologies où la concentration en CyPB est augmentée et dans des cas d'infection par le HIV-1 (Sherry *et al.*, 1992 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; Tegeder *et al.*, 1997 ; Endrich & Gehring, 1998 ; Jin *et al.*, 2000). De façon plus générale, c'est la compréhension de l'ensemble des mécanismes liés à l'activité de la CyPB qui pourrait être à la base de nouvelles approches thérapeutiques pour bloquer l'entrée du virus HIV-1. En effet, nos résultats ont établi que le CD147 et les syndécans sont des molécules de co-activation du récepteur fonctionnel de la CyPB. Or ces composés ont également été décrits comme des cibles potentielles d'interaction avec le virus HIV-1. Ainsi, l'implication du CD147 et des syndécans dans le complexe récepteur de la CyPB sous-entend que cette protéine jouerait un rôle clé dans la pathogenèse liée au HIV-1. En détournant les fonctions premières de ce récepteur, le virus pourrait faciliter sa fixation et son entrée dans les cellules cibles. Par conséquent, la compréhension des mécanismes liés à l'activité de la CyPB permettrait de mieux appréhender le rôle exact des syndécans et du CD147 dans l'infection du HIV-1, et de développer de nouvelles stratégies pour bloquer l'entrée du virus.

Bibliographie

- Abraham R.T. (1998) Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr. Opin Immunol.* **10**, 330-336
- Adams D.H., Harvath L., Bottaro D.P., Interrante R., Catalano G., Tanaka Y., Strain A., Hubscher S.G. and Shaw S. (1994) Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 beta: structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 7144-7148.
- Ahrens T., Sleeman J.P., Schempp C.M., Howells H., Hofmann M., Pontaa H., Herrlich P. and Simon J.C. (2001) Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid. *Oncogene* **20**, 3399-3408
- Aikawa J., Grobe K., Tsujimoto M. and Esko J.D. (2001) Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4. *J. Biol. Chem.* **276**, 5876-5882
- Alexander C.M., Reichsman F., Hinkes M.T., Lincecum J., Becker K.A., Cumberledge S. and Bernfield M. (2000) Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat. Genet.* **25**, 329-332
- Allain F., Denys A. and 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. and Spik G. (1995) Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies. *J. Immunol. Methods.* **178**, 113-120
- Allain F., Denys A. and 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** , 565-570
- Allain F., Durieux S., Denys A., Carpentier M. and Spik G. (1999) Cyclophilin B binding to platelets supports calcium-dependent adhesion to collagen. *Blood.* **94**, 976-983
- Allain F., Vanpouille C., Carpentier M., Slomianny M-C., Durieux S. and Spik G. (2002) Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2714-2719
- Anderson S.K., Gallinger S., Roder J., Frey J., Young H.A. and Ortaldo J.R. (1993) A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 542-546
- Aramburu J., Rao A. and Klee C.B. (2000) Calcineurin: from structure to function. *Current Topic Cell. Reg.* **36**, 237-295
- Arber S., Krause K.H. and Caroni P. (1992) s-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J. Cell. Biol.* **116**, 113-125
- Ashikari S., Habuchi H. and Kimata K. (1995) Characterization of heparan sulfate oligosaccharides that bind to hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.* **270**, 29586-29593
- Asundi V.K., Keister B.F., Stahl R.C. and Carey D.J. (1997) Developmental and cell-type-specific expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans in the rat heart. *Exp. Cell Res.* **230**, 145-153
- Aviezer D., Iozzo R.V., Noonan D.M. and Yayon A. (1997) Suppression of autocrine and paracrine functions of basic fibroblast growth factor by stable expression of perlecan antisense cDNA. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1938-1946.
- Avraham S., Stevens R.L., Nicodemus C.F., Gartner M.C., Austen K.F. and Weis J.H. (1989) Molecular cloning of a cDNA that encodes the peptide core of a mouse mast cell secretory granule proteoglycan and comparison with the analogous rat and human cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3763-3767
- Azhderian E.M., Kolipaka J., Vives K. and Lorber M.I. (1993) Nucleus associated FK 506 binding proteins with potential relevance to FK 506 immunosuppression. *Transplant. Proc.* **25**, 662-664
- Bächinger H.P. (1987) The influence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the in vitro folding of type III collagen. *J. Biol. Chem.* **262**, 17144-17148

- Baciu P.C., Saoncella S., Lee S.H., Denhez F., Leuthardt D. and Goetinck P.F. (2000) Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeleton organization. *J. Cell Sci.* **113**, 315-324
- Bai X.M. & Esko J.D. (1996) An animal cell mutant defective in heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfation. *J. Biol. Chem.* **271**, 17711-17717
- Bai X.M., Wei G., Sinha A. and Esko J.D. (1999) Chinese hamster ovary cell mutants defective in glycosaminoglycan assembly and glucuronosyltransferase I. *J. Biol. Chem.* **274**, 13017-13024
- Bajorath J. (2000) Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* **39**, 103-111
- Bame K., Reddy R. and Esko J. (1991) Coupling of N-deacetylation and N-sulfation in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in heparan sulfate N-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* **266**, 12461-12468
- Bame K.J. (2001) Heparanases : endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* **11**, 91-98
- Bang H., Muller W., Hans M., Brune K. and Swandulla D. (1995) Activation of Ca²⁺ signaling in neutrophils by the mast cell-released immunophilin FKBP12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3435-3438
- Barragan A., Spillmann D., Carlson J. and Wahlgren M. (1999) Role of glycans in *Plasmodium falciparum* infection. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 487-494
- Barre J. (1992) Les formes circulantes de la cyclosporine A. *Therapie* **47**, 301-304
- Barret C., Roy C., Montcourrier P., Mangeat P. and Niggli V. (2000) Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J. Cell Biol.* **151**, 1067-1080
- Bartz S.R., Hohenwarter E., Hu M.K., Rich D.H. and Malkovsky M. (1995) Inhibition of human immunodeficiency virus replication by nonimmunosuppressive analogs of cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5381-5385
- Bass M.D. & Humphries M.J. (2002) Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem. J.* **368**, 1-15
- Battaglia C., Aumailley M., Mann K., Mayer U. and Timpl R. (1993) Structural basis of beta 1 integrin-mediated cell adhesion to a large heparan sulfate proteoglycan from basement membranes. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 92-99
- Bechard D., Meignin V., Scherpereel A., Oudin S., Kervoaze G., Bertheau P., Janin A., Tonnel A. and Lassalle P. (2000) Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J. Vasc. Res.* **37**, 417-425
- Bechard D., Gentina T., Delehedde M., Scherpereel A., Lyon M., Aumercier M., Vazeux R., Richet C., Degand P. Jude B., Janin A., Fernig D.G., Tonnel A.B. and Lassalle P. (2001) Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 48341-48349
- Belting M., Persson S. and Fransson L-A. (1999) Proteoglycan involvement in polyamine uptake. *Biochem. J.* **338**, 317-323
- Belting M., Borsig L., Fuster M.M., Brown J.R., Persson L., Fransson L-A. and Esko J.D. (2002) Tumor attenuation by combined heparan sulfate and polyamine depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 371-376
- Belting M. (2003) Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 145-151
- Bennett K.L., Jackson D.G., Simon J.C., Tanczos E., Peach R., Modrell B., Stamenkovic I., Powman G. and Aruffo A. (1995) CD44 isoforms containing exon v3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J. Cell. Biol.* **128**, 687-698
- Bensadoun E.S., Burke A.K., Hogg J.C. and Roberts C.R. (1997) Proteoglycans in granulomatous lung diseases. *Eur. Respir. J.* **10**, 2731-2737

- Berditchevski F., Chang S., Bodorova J. and Hemler M.E. (1997) Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J. Biol. Chem.* **272**, 29174-29180
- Bergsma D.J., Eder C., Gross M., Kersten H., Sylvester D., Appelbaum E., Cusimano D., Livi G.P., McLaughlin M.M., Kasyan K., Porter T.G., Silverman C., Dunnington D., Hand A., Prichett W.P., Bossard M.J., Brandt M. and Levy M.A. (1991) The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. Characterization of three separate human isoforms. *J. Biol. Chem.* **266**, 23204-23214
- Bernfield M., Kokenyesi R., Kato M., Hinkes M.T., Spring J., Gallo R.L. and Lose E.J. (1992) Biology of the syndecans : a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 365-393
- Bernfield M., Gotte M., Park P.W., Reizes O., Fitzgerald M.L., Lincecum J. and Zako M. (1999) Functions of cell surface heparin sulphate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 729-777
- Bierer. B, Somers P.K., Wandless T.J., Burakoff S.J. and 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. and 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. and Burakoff S.J. (1991) The effect of the immunosuppressant FK-506 on alternate pathways of T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **21**, 439-445
- Bignami A., Perides G. and Rahemtulla F. (1993) Versican, a hyaluronate-binding proteoglycan of embryonal precartilaginous mesenchyma, is mainly expressed postnatally in rat brain. *J. Neurosci. Res.* **34**, 97-106
- Billich A., Hammerschmid F., Peichl P., Wenger R., Zenke G., Quesniaux V and Rosenwirth B. (1995) Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1 : interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *J. Virol.* **69**, 2451-2461
- Billich A., Winkler G., Aschauer H., Rot A. and Peichl P. (1997) Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **185**, 975-980
- Biswas C., Zhang Y., DeCastro R., Guo H., Nakamura T., Kataoka H. and Nabeshima K. (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* **55**, 434-439
- Blankenship J.R., Steinbach W.J., Perfect J.R. and Heitman J. (2003) Teaching old drugs new tricks : reincarnating immunosuppressants as antifungal drugs. *Curr. Opin. Investig. Drug* **4**, 192-199
- Blobe G.C., Liu X., Fang S.J., How T. and Lodish H.F. (2001) A novel mechanism for regulating transforming growth factor β (TGF- β) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *J. Biol. Chem.* **276**, 39608-39617
- Bobardt M.D., Saphire A.C.S., Hung H.C., Yu X., Van der Schueren B., Zhang Z., David G. and Gallay P.A. (2003) Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity* **18**, 27-39
- Borel J.F., Feurer C., Gubler H.U. and Stähelin H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents and Actions* **6**, 468-475
- Borland G., Ross J.A. and Guy K. (1998) Forms and functions of CD44. *Immunology* **93**, 139-148
- Bourdon M.A., Oldberg A., Pierschbacher M. and Ruoslahti E. (1985) Molecular cloning and sequence analysis of a chondroitin sulfate proteoglycan cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1321-1325
- Bourguignon L.Y.W. (1996) Interactions between the membrane-cytoskeleton and CD44 during lymphocyte signal transduction and cell adhesion. *Curr. Topics. Membr.* **43**, 293-312
- Bourguignon L.Y.W., Zhu D. and Zhu H. (1998) CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front. Biosci.* **3**, 637-649
- Bourguignon L.Y.W., Zhu H., Shao L., Zhu D. and Chen Y.W. (1999) Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **43**, 269-287

- Bourguignon L.Y.W., Zhu H., Sha L. and Chen Y.W. (2000a) CD44 interaction with Tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J. Biol. Chem.* **275**, 1829-1838
- Bourguignon L.Y.W., Zhu H., Sha L. and Chen Y.W. (2000b) Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *J. Cell. Biol.* **150**, 177-191
- Bourguignon L.Y.W., Zhu H., Shao L. and Chen Y.W. (2001a) CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J. Biol. Chem.* **276**, 7327-7333
- Bourguignon L.Y.W., Zhu H., Zhou B., Diedrich F., Singleton P.A. and Hung M-C. (2001b) Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signalling during ovarian tumor cell migration and growth. *J. Biol. Chem.* **277**, 48679-48692
- Braaten D., Wellington S., Warburton D. and 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. and Luban J. (1996b) Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J. Virol.* **70**, 3551-3560
- Braaten D, Ansari H, and Luban J. (1997) The hydrophobic pocket of cyclophilin is the binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J. Virol.* **71**, 2107-2113
- Braaten D. & Luban J. (2001) Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T-cells. *EMBO J.* **20**, 1300-1309
- Bram R.J. & Crabtree G.R. (1994) Calcium signaling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* **371**, 355-358
- Bretscher A. (1999) Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 109-116
- Brickman Y.G., Ford M.D., Gallagher J.T., Nurcombe V., Bartlett P.F. and Turnbull J.E. (1998) Structural modification of fibroblast growth factor-binding heparan sulfate at a determinative stage of neural development. *J. Biol. Chem.* **273**, 4350-4359
- Brockstedt U., Dobra K., Nurminen M. and Hjerpe A. (2002) Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus : tubulin-dependent rearrangements. *Exp. Cell Res.* **274**, 235-245
- Brown D.A. & Rose J.K. (1992) Sorting of a GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544
- Brown L.F., Guidi A.J., Schnitt S.J., Van De Water L., Iruela-Arispe M.L., Yeo T.K., Tognazzi K. and Dvorak H.F. (1999) Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1041-1056
- Brunner G., Gabrilove J., Rifkin D.B. and Wilson E.L. (1991) Phospholipase C release of basic fibroblast growth factor from human bone marrow cultures as a biologically active complex with a phosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan. *J. Cell Biol.* **114**, 1275-1283
- Brunner G., Metz C.N., Nguyen H., Gabrilove J., Patel S.R., Davitz M.A. Rifkin D.B. and Wilson E.L. (1994) An endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D releases basic fibroblast growth factor-heparan sulfate proteoglycan complexes from human bone marrow culture. *Blood* **83**, 2115-2125
- Buczek-Thomas J.A. & Nugent M.A. (1999) Elastase-mediated release of heparan sulfate proteoglycans from pulmonary fibroblast cultures. A mechanism for basic fibroblast growth factor (bFGF) release and attenuation of bfgf binding following elastase-induced injury. *J. Biol. Chem.* **274**, 25167-25172
- Bukrinsky M.I. (2002) Cyclophilins : unexpected messengers in intercellular communications. *Trends immunol.* **7**, 323-325
- Buttini M., Limonta S., Luyten M. and Boddeke H. (1995) Distribution of calcineurin A isoenzyme mRNA in rat thymus and kidney. *Histochem. J.* **27**, 291-299

- Cadene M., Boudier C., de Marcillac G.D. and Bieth J.G. (1995) Influence of low molecular mass heparin on the kinetics of neutrophil elastase inhibition by mucus proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **270**, 13204-13209
- Cano-Gauci D.F., Song H.H., Yang H., McKerlie C., Choo B., Shi W., Pullano R., Piscione T.D., Grisaru S., Soon S., Sedlackova L., Tanswell A.K., Mark T.W., Yeger H., Lockwood G.A., Rosenblum J. and Filmus J. (1999) Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J. Cell Biol.* **146**, 255-264
- Capila I. & Linhardt R.J. (2002) Heparin-protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 391-412
- Cardin A.D. & Weintraub H.J. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **9**, 21-32
- Carey D.J. (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* **327**, 1-16
- Caroni P., Rothenfluh A., McGlynn E. and Schneider C. (1991) S-cyclophilin. New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 10739-10742
- Carpentier M., Allain F., Haendler B., Denys A., Mariller C., Benaïssa M. and Spik G. (1999a) Two distinct regions of cyclophilin B are involved in the recognition of a functional receptor and of glycosaminoglycans on T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10990-10998
- Carpentier M., Descamps L., Allain F., Denys A., Durieux S., Kieda C., Cecchelli R. and Spik G. (1999b) Receptor-mediated transcytosis of cyclophilin B through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* **73**, 260-270
- Carpentier M., Allain F., Haendler B., Slomianny M.C. and Spik G. (2000) Delineation of the calcineurin-interacting region of cyclophilin B. *Protein Science* **9**, 2386-2393
- Carpentier M., Allain F., Slomianny M.C., Durieux S., Vanpouille C., Haendler B. and Spik G. (2002) Receptor type I and type II binding regions and the peptidyl-prolyl isomerase site of cyclophilin B are required for enhancement of T-lymphocyte adhesion to fibronectin. *Biochemistry* **41**, 5222-5229
- Casu B., Oreste P., Torri G., Zoppetti G., Choay J., Lormeau J.C., Petitou M. and Sinay P. (1981) The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and ¹³C nuclear-magnetic-resonance studies. *Biochem J.* **197**, 599-609
- Casu B. & Lindahl U. (2001) Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **57**, 159-206
- Caterson B., Flannery C.R., Hughes C.E. and Little C.B. (2000) Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol.* **19**, 333-344
- Chakravarti S., Magnuson T., Lass J.H., Jepsen K.J., LaMantia C. and Carroll H. (1998) Lumican regulates collagen fibril assembly : skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell Biol.* **141**, 1277-12786
- Chambers C.A., Gallinger S., Anderson S.K., Giardina S., Ortaldo J.R., Hozumi N. and Roder J. (1994) Expression of the NK-TR gene is required for NK-like activity in human T cells. *J. Immunol.* **152**, 2669-2674
- Cheng F., Mani K., van den Born J., Ding K., Belting M. and Fransson L-A. (2002) Nitric oxide-dependent processing of heparan sulfate in recycling S-nitrosylated glypican-1 takes place in caveolin-1-containing endosomes. *J. Biol. Chem.* **277**, 44431-44439
- Chen Y., Maguire T., Hileman R.E., Fromm J.R., Esko J.D., Linhardt R.J. and Marks R.M. (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* **3**, 866-871
- Chen R.L. & Lander A.D. (2001) Mechanisms underlying preferential assembly of heparan sulfate on glypican-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 7507-7517
- Chiu H-C., Wang F.D., Yao S.Y. and Wang C.T. (2002) Effects of gag mutations on human immunodeficiency virus type 1 particle assembly, processing, and cyclophilin A incorporation. *J. Med. Virol.* **68**, 156-163

- Cho J.Y., Fox D.A., Horejsi V., Sagawa K., Skubitz K.M., Katz D.R. and Chain B. (2001) The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* **98**, 374-382
- Cirillo R., Triggiana M., Siri L., Cicarelli A., Pettit G.R., Condorelli M. and Marone G. (1990) Cyclosporin A rapidly inhibits mediator release from human basophils presumably by interacting with cyclophilin. *J. Immunol.* **144**, 3891-3897
- Clarke D., Katoh O., Gibbs R.V., Griffiths S.D. and Gordon M.Y. (1995) Interaction of interleukin 7 (IL-7) with glycosaminoglycans and its biological relevance. *Cytokine* **7**, 325-330
- Cohen A.R., Woods D.F., Marfatia S.M., Walther Z., Chishti A.H. and Anderson J.M. (1998) Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **142**, 129-138
- Cohen S.S. (1998) A guide to the polyamines. *Oxford University Press*, New York
- Colgan J., Yuan H.E.H., Franke E.K. and 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
- Colin S., Jeanny J.C., Mascarelli F., Vienet R., Al-Mahmood S., Courtois Y. and Labarre J. (1999) In vivo involvement of heparan sulfate proteoglycan in the bioavailability, internalization, and catabolism of exogenous basic fibroblast growth factor. *Mol. Pharmacol.* **1**, 74-82
- Collins S.J. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**, 1233-1244
- 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
- Conrad H.E. (1998) Heparin-binding Proteins. *Academic Press*, New York
- Corallini A., Altavilla G., Pozzi L., Bignozzi F., Negrini M., Rimessi P., Gualandi F. and Barbanti-Brodano G. (1993) Systemic expression of HIV-1 tat gene in transgenic mice induces endothelial proliferation and tumors of different histotypes. *Cancer Res.* **53**, 5569-5575
- Costell M., Gustafsson E., Aszodi A., Morgelin M., Bloch W., Hunziker E., Addicks K., Timpl R. and Fassler R. (1999) Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J. Cell Biol.* **147**, 1109-1122
- Couchman J.R., Chen L. and Woods A. (2001) Syndecans and cell adhesion. *Int. Rev. Cytol.* **207**, 113-150
- Craven S.E. & Bredt D.S. (1998) PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* **93**, 495-498
- Crompton M., Ellinger H. and Costi A. (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**, 357-260
- Crompton M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**, 233-249
- Damon D.H., Lobb R.R., D'Amore P.A. and Wagner J.A. (1989) Heparin potentiates the action of acidic fibroblast growth factor by prolonging its biological half-life. *J. Cell Physiol.* **138**, 221-226
- Danielson P.E., Forss-Peter S., Brow M.A., Calavetta L., Douglass J., Milner R.J. and Sutcliffe J.G. (1988) p1B15 : A cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* **7**, 261-267
- Danovitch G.M. (1999) Choice of immunosuppressive drugs and individualization of immunosuppressive therapy for kidney transplant patients. *Transplant Proc.* **31**, 2S-6S
- Das S.K., Mallet J-M., Esnault J., Driguez P-A., Duchaussoy P., Sizun P., Héroult J-P., Herbert J-M., Petitou M. and Sinay P. (2001) Synthesis of Conformationally Locked Carbohydrates: A Skew-Boat

- Conformation of L-Iduronic Acid Governs the Antithrombotic Activity of Heparin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 1670-1673
- David G., Lories V., Decock B., Marynen P., Cassiman J.J. and Van den Berghe H. (1990) Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts. *J. Cell Biol.* **111**, 3165-3176
- Davies R.J., Edwards P.R., Watts H.J., Lowe C.R., Buckl P.E., Yeung D., Kinning T.M. and Pollard-Knight D.V. (1994) in *techniques in protein Chemistry V*, Academic Press, San Diego pp. 285-292
- Davis J.M., Boswell B.A. and Bachinger H.P. (1989) Thermal stability and folding of type IV procollagen and effect of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase on the folding of the triple helix. *J. Biol. Chem.* **264**, 8956-8962
- Day R.M., Mitchell T.J., Knight S.C. and Forbes A. (2003) Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine* **21**, 224-233
- Deakin J.A. & Lyon M. (1999) Differential regulation of hepatocyte growth factor by cell surface proteoglycans and free glycosaminoglycan chains. *J. Cell Sci.* **112**, 1999-2009
- De Cat B. & David G. (2001) Developmental roles of the glypicans. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 117-125
- De Ceuninck F., Allain F., Caliez A., Spik G. and Vanhoutte P.M. (2003) High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans, an dits release from the cell surface by metalloproteinases. *Arthritis Rheum. (sous presse)*
- Defilippi P., Bozzo C., Volpe G., Romano G., Venturino M., Silengo L. and Tarone G. (1994) Integrin-mediated signal transduction in human endothelial cells : analysis of tyrosine phosphorylation events. *Cell Adhe. Commun.* **2**, 75-86
- Delehedde M., Seve M., Sergeant N., Wartelle I., Lyon M., Rudland P.S. and Fernig D.G. (2000) Fibroblast growth factor-2 stimulation of p42/44MAPK phosphorylation and IkappaB degradation is regulated by heparan sulfate/heparin in rat mammary fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **275**, 33905-33910
- Delehedde M., Lyon M., Sergeant N., Rahmoune H. and Fernig D.G. (2001) Proteoglycans : pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **6**, 253-273
- Delehedde M. (2002) Heparan sulfate as a key partner in the regulation of growth factor activities. *Recent Res. Devel. Biol. Chem.* **1**, 133-149
- Delehedde M., Allain F., Payne S.J., Borgo R., Vanpouille C., Fernig D.G. and Deudon E. (2002a) Proteoglycans in inflammation. *Curr. Med. Chem.* **1**, 89-102
- Delehedde M., Lyon M., Vidyasagar R., McDonnell T.J. and Fernig D.G. (2002b) Hepatocyte growth factor/scatter factor binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates the proliferation of human HaCaT keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 12456-12462
- Delehedde M., Lyon M., Gallagher J.T., Rudland P.S. and Fernig D.G. (2002c) Fibroblast growth factor-2 binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates a sustained phosphorylation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and proliferation of rat mammary fibroblasts. *Biochem. J.* **366**, 235-244
- De Luca A., Santra M., Baldi A., Giordano A. and Iozzo R.V. (1996) Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 18961-18965
- del Pozo M.A., Vicente-Manzanares M., Tejedor R., Serrador J.M. and Sanchez-Madrid F. (1999) Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3609-3620
- Denhez F., Wilcox-Adelman S.A., Baciuc P.C., Saoncella S., Lee S., French B., Neveu W. and Goetinck P.F. (2002) Syndesmos, a syndecan-4 cytoplasmic domain interactor, binds to the focal adhesion adaptor proteins paxillin and Hic-5. *J. Biol. Chem.* **277**, 12270-12274
- Denys A., Allain F., Foxwell B. and Spik G. (1997) Distribution of cyclophilin B-binding sites in the subsets of human peripheral blood lymphocytes. *Immunology* **91**, 609-617

- Denys A., Allain F., Carpentier M. and Spik G. (1998a) Involvement of two classes of binding sites in the interactions of cyclophilin B with peripheral blood T-lymphocytes. *Biochem. J.* **336**, 689-697.
- Denys A., Allain F., Masy E., Dessaint J.P. and Spik G. (1998b) Enhancing the effect of secreted cyclophilin B on immunosuppressive activity of cyclosporin. *Transplantation* **65**, 1076-1084
- Derksen P.W., Keehnen R.M., Evers L.M., van Oers M.H., Spaargaren M. and Pals S.T. (2002) Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signalling in multiple myeloma. *Blood* **99**, 1405-1410
- Dewhurst S., Gelbard H.A. and Fine S.M. (1996) Neuropathogenesis of AIDS. *Mol. Med. Today* **2**, 16-23
- Ding K., Jönsson M., Mani K., Sandgren S., Belting M. and Fransson L.A. (2001a) N-Unsubstituted glucosamine in heparan sulfate of recycling glypican-1 from suramin-treated and nitrite-deprived endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 3885-3894
- Ding K., Sandgren S., Mani K., Belting M. and Fransson L.A. (2001b) Modulations of glypican-1 heparan sulfate structure by inhibition of endogenous polyamine synthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 46779-46791
- Ding K., Mani K., Cheng F., Belting M. and Fransson L.A. (2002) Copper-dependent autocleavage of glypican-1 heparan sulfate by nitric oxide derived from intrinsic nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* **277**, 33353-33360
- Dorfman T., Weimann A., Borsetti A., Walsh C.T. and 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
- Dowd C.J., Cooney C.L. and Nugent M.A. (1999) Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 5236-5244
- Doyle V., Virji S. and Crompton M. (1999) Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress. *Biochem. J.* **341**, 127-132
- Dumont F.T., Staruch M.J., Koprak S.K., Melino M.R. and 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
- Dunzendorfer S., Kaneider N., Rabensteiner A., Meierhofer C., Reinisch C., Romisch J. and Wiedermann C.J. (2001) Cell-surface heparan sulfate proteoglycan-mediated regulation of human neutrophil migration by the serpin antithrombin III. *Blood* **97**, 1079-1085
- Dutta S., Maity N.R. and Bhattacharyya D. (1997) Multiple unfolded states of UDP-galactose 4-epimerase from yeast *Kluyveromyces fragilis*. Involvement of proline cis-trans isomerization in reactivation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1343**, 251-262
- Dutz J.P., Fruman D.A., Burakoff S.J. and Bierer B.E. (1993) A role for calcineurin in degranulation of murine cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **150**, 2591-2598
- Echtermeyer F., Baciuc P.C., Saoncella S., Ge Y. and Goetinck P.F. (1999) Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J. Cell Sci.* **112**, 3433-3441
- Edwards P.R., Gill A., Pollardkinght D.V., Hoare M., Buckle P.E., Lowe P.A. and Leatherbarrow R.J. (1995) Kinetics of protein-protein interactions at the surface of an optical biosensor. *Anal. Biochem.* **231**, 210-217
- Edwards P.R. & Leatherbarrow R.J. (1997) Determination of association rate constants by an optical biosensor using initial rate analysis. *Anal. Biochem.* **246**, 1-6
- Eickelberg O., Centrella M., Reiss M., Kashgarian M. and Wells R.G. (2002) Betaglycan inhibits TGF- β signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 823-829
- Elenius K., Salmivirta M., Inki P., Mali M. and Jalkanen M. (1990) Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 17837-17843
- Elenius K., Vainio S., Laato M., Salmivirta M., Thesleff I. and Jalkanen M. (1991) Induced expression of syndecan in healing wounds. *J. Cell Biol.* **114**, 585-595
- Elenius K., Maatta A., Salmivirta M. and Jalkanen M. (1992) Growth factors induce 3T3 cells to express bFGF-binding syndecan. *J. Biol. Chem.* **267**, 6435-6441

- Ellis S.M., Nabeshima K. and Biswas C. (1989) Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res.* **49**, 3385-3391
- Endrich M.M. & Gehring H. (1998) The V3 loop of human immunodeficiency virus type-1 envelope protein is a high-affinity ligand for immunophilins present in human blood. *Eur. J. Biochem.* **252**, 441-446
- Ensoli B., Buonaguro L., Barillari G., Fiorelli V., Gendelman R., Morgan R.A., Wingfield P. and Gallo R.C. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* **67**, 277-287
- Ensoli B., Gendelman R., Markham P., Fiorelli V., Colombini S., Raffeld M., Cafaro A., Chang H.K., Brady J.N. and Gallo R.C. (1994) Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature* **371**, 674-680
- Esko J.D. & Lindahl U. (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.* **108**, 169-173
- Esko J.D. & Selleck S.B. (2002) Order out of chaos : assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 435-471
- Ethell I.M., Hagihara K., Miura Y., Irie F. and Yamaguchi Y. (2000) Synbindin, a novel syndecan-2-binding protein in neuronal dendritic spines. *J. Cell Biol.* **151**, 53-67
- Ezura Y., Chakravarti S., Oldberg A., Chervoneva I. and Birk D.E. (2000) Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J. Cell Biol.* **151**, 779-788
- Faham S., Hileman R.E., Fromm J.R., Linhardt R.J. and Rees D.C. (1996) Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* **271**, 1116-1120
- Fehr T., Kallen J., Oberer L., Sanglier J.J. and Schilling W. (1999) Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110.II. Structure elucidation, stereochemistry and physico-chemical properties. *J. Antibiot.* **52**, 474-479
- Fernig D.G. (2001) Optical biosensor techniques to analyze protein-polysaccharide interactions. *Methods Mol. Biol.* **171**, 505-518
- Feyzi E., Saldeen T., Larsson E., Lindahl U. and Salmivirta M. (1998) Age-dependent modulation of heparan sulfate structure and function. *J. Biol. Chem.* **273**, 13395-13398
- Filmus J., Church J. and Buick R.N. (1988) Isolation of a cDNA corresponding to a developmentally regulated transcript in rat intestine. *Mol. Cell Biol.* **8**, 4243-4249
- Filmus J. & Song H.H. (2000) in R.V. Iozzo (Ed), *Proteoglycans*, Marcel Dekker, New-York pp. 161-176
- Filmus J. (2001) Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology* **11**, 19-23
- Filmus J. & Selleck S.B. (2001) Glypicans : proteoglycans with a surprise. *J. Clin. Invest.* **108**, 497-501
- Fischer G., Bang H. and Mech C. (1984) Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta.* **43**, 1101-1111
- 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. and Schmid F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**, 476-478
- Fischer G. (1994) Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and their effectors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1415-1436
- Fischer G. (1996) Cyclophilins in the context of the other families of peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases. *Workshop cyclophilin structure and function. Lille (France)*, 1-9
- Flanagan W.M., Corthesy B., Bram R.J. and Crabtree G.R. (1991) Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* **352**, 803-807
- Flaumenhaft R., Moscatelli D. and Rifkin D.B. (1990) Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* **111**, 1651-1659

- Formica R.N., Lorber K.M., Friedman A.L., Bia M.J., Lakkis F., Smith J.D. and Lorber M.I. (2003) Sirolimus-based immunosuppression with reduce dose cyclosporine or tacrolimus after renal transplantation. *Transplant Proc.* **35**, S95-98
- Forster-Horvath C., Bocsi J., Raso E., Orban T.I., Olah E., Timar J. and Ladanyi A. (2001) Constitutive intracellular expression and activation-induced cell surface up-regulation of CD44v3 in human lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **31**, 600-608
- Franke E.K., Yuan H.E. and Luban J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**, 359-362
- Fransson L.A., Belting M., Edgren G., Jonsson M., Katrin M., Schmidtchen A. and Wiik P. (1998) Degradation and reprocessing of heparan sulphate in recycling glypican (heparan sulphate proteoglycan). *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **10**, 81-94
- Fransson L.A., Belting M., Jönsson M., Mani K., Moses J. and Oldberg A. (2000) Biosynthesis of decorin and glypican. *Matrix Biol.* **19**, 367-376
- Fraser J.R., Laurent T.C. and Laurent U.B. (1997) Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **242**, 27-33
- French M.M., Smith S.E., Akanbi K., Sanford T., Hecht J., Farach-Carson M.C. and Carson D.D. (1999) Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro. *J. Cell Biol.* **145**, 1103-1115
- Freskgard P.O., Bergenham N., Jonsson B.H., Svensson M. and Carlsson U. (1992) Isomerase and chaperons activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase. *Science* **258**, 467-468
- Fretz H., Albers M.A., Galat A., Standaert R.F., Lane W.S., Burakoff S.J., Bierer B.E. and Schreiber S.L. (1991) Rapamycin and FK506 binding proteins. *Am. Chem. Soc.* **113**, 1409-1410
- Frey J.L., Bino T., Kantor R.R.S., Segal D.M., Giardina S.L. Roder J., Anderson S. and 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
- Fruman D.A., Mather P.E., Burakoff S.J. and Bierer B.E. (1992) Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2513-2517
- Fry E.E., Lea S.M., Jackson T., Newman J.W.I., Ellard F.M., Blakemore W.E., Abu-Ghazaleh R., Samuel A., King A.M.Q. and Stuart D.I. (1999) The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *EMBO J.* **18**, 543-554
- Funderburgh J.L. (2000) Keratan sulfate : structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* **10**, 951-958
- Gaido M. & Cidlowski J. (1991) Identification, purification and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC 18) from apoptotic rat thymocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 18580-18585
- Galat A., Lane W.S., Standaert R.F. and Schreiber S.L. (1992) A rapamycin-selective 25-kDa immunophilin. *Biochemistry* **31**, 2427-2434
- Galat A. & Bouet F. (1994) Cyclophilin-B is an abundant protein whose conformation is similar to cyclophilin-A. *FEBS Lett.* **347**, 31-36
- Galat A. & Metcalfe S.M. (1995) Peptidylproline cis/trans isomerases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **63**, 67-118
- Galat A. (1999) Variations of sequences and amino acid compositions of proteins that sustain their biological functions: An analysis of the cyclophilin family of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 149-162
- Galat A. (2000) Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4945-4959
- Gallagher J.T. (1989) The extended family of proteoglycans : social residents of the pericellular zone. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 1201-1218

- Gallagher J.T. & Turnbull J.E. (1992) Heparan sulphate in the binding and activation of basic fibroblast growth factor. *Glycobiology* **2**, 523-528
- Gallagher J.T. (1998) The interaction and regulation of basic and acidic fibroblast growth factors by heparan sulfate. *Trends Glycosci. Glycobiol.* **10**, 137-144
- Gallagher J.T. & Lyon M. (2000) Proteoglycans : Structure, Biology and Molecular Interactions. *Iozzo R.V., Eds. Marcel Dekker : New-York*, pp27-60
- Gallagher J.T. (2001) Heparan sulphate : growth control with a restricted sequence menu. *J. Clin. Invest.* **108**, 357-361
- Gao Y., Li M., Chen W. and Simons M. (2000) Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J. Cell. Physiol.* **184**, 373-379
- George A.J.T., Danga R., Gooden C.S.R., Epenetos A.A. and Spooner R.A. (1995) Quantitative and qualitative detection of serum antibodies using a resonant mirror biosensor. *Tumour Target* **1**, 245-250
- Gething M. J. & Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45
- Giardina S.L., Coffman J.D., Young H.A., Potter S.J., Frey J.L., Ortaldo J.R. and Anderson S.K. (1996) Association of the expression of an SR-cyclophilin with myeloid cell differentiation. *Blood* **87**, 2269-2274
- Gilat D., Hershkoviz R., Mekori Y.A., Vlodavsky I. and Lider O. (1994) Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. *J. Immunol.* **153**, 4899-906
- Gill A., Harrison J., Holwill I., Lowe P.A. and Hoare M (1996) Determination of bioactive protein product produced during fermentation using an optical biosensor. *Protein Peptide Lett.* **3**, 199-206
- Goger B., Halden Y., Rek A., Mosl R., Pye D., Gallagher J. and Kungl A.J. (2002) Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites. *Biochemistry.* **41**, 1640-1646
- Gold L.I. (1999) The role for transforming growth factor-beta (TGFβ) in human cancer. *Crit. Rev. oncog.* **10**, 303-360
- Gonzalez-Cuadrado S., Bustos C., Ruiz-Ortega M., Ortiz A., Guijarro C., Plaza J.J. and Egido J. (1996) Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 518-522
- Goodison S., Urquidi V. and Tarin D. (1999) CD44 cell adhesion molecules. *J. Clin. Pathol.* **52**, 189-196
- Gospodarowicz D & Cheng J. (1986) Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. Cell Physiol.* **128**, 475-484
- Graham G.J., Wilkinson P.C., Nibbs R.J., Lowe S., Kolset S.O., Parker A., Freshney M.G., Tsang M.L. and Pragnell I.B. (1996) Uncoupling of stem cell inhibition from monocyte chemoattraction in MIP-1alpha by mutagenesis of the proteoglycan binding site. *EMBO J.* **15**, 6506-6515
- Graneli-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
- Granés F., Urena J.M., Rocamora N. and Vilaro S. (2000) Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **113**, 1267-1276
- Grättinger M., Hohenberg H., Thomas D., Wilk T., Muller B. and Krausslich H.G. (1999) *In vitro* assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology* **257**, 247-2660
- Greenfield B., Wang W-C., Marquardt H., Piepkorn M., Wolf E.A., Aruffo A. and Bennett K.L. (1999) Characterization of the heparan sulfate and chondroitin sulfate assembly sites in CD44. *J. Biol. Chem.* **274**, 2511-2517
- Greiling H. (1994) Proteoglycans. *Eds. P.Jolles, Birkhauser Verlag : Basel*, pp. 101-122
- Griffiths E.J. & Halestrap A.P. (1991) Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from Ca²⁺ overload by inhibiting a matrix peptidylprolyl *cis-trans* isomerase. *Biochem. J.* **274**, 611-614

- Grisaru S., Cano-Gauci D., Tee J., Filmus J. and Rosenblum N.D. (2001) Glypican-3 modulates BMP- and FGF-mediated effects during renal branching morphogenesis. *Dev. Biol.* **231**, 31-46
- Grootjans J.J., Zimmermann P., Reekmans G., Smets A., Degeest G., Durr J. and David G. (1997) Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13683-13688
- Grootjans J.J., Reekmans G., Ceulemans H. and David G. (2000) Syntenin-syndecan binding requires syndecan-synteny and the co-operation of both PDZ domains of syntenin. *J. Biol. Chem.* **275**, 19933-19941
- Habuchi O. (2000) Diversity and functions of glycosaminoglycan sulfotransferases. *Biochim. Biophys. Acta* **1474**, 115-127
- Habuchi H., Tanaka M., Habuchi O., Yoshida K., Suzuki H., Ban K. and Kimata K. (2000) The occurrence of three isoforms of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase having different specificities for hexuronic acid adjacent to the targeted N-sulfoglucosamine. *J. Biol. Chem.* **275**, 2859-2868
- Haegel-Kronenberger H., de la Salle H., Bohbot A., Oberling F., Cazenave J.P. and Hanau D. (1998) Adhesive and/or signaling functions of CD44 isoforms in human dendritic cells. *J Immunol.* **161**, 3902-3911
- Haendler B., Hofer-Warbinek R. and Hofer E. (1987) Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO J.* **6**, 947-950
- Haendler B., Keller R., Hiestand P.C., Kocher H.P., Wegmann G. and Movva N.R. (1989) Yeast cyclophilin: isolation and characterization of the protein, cDNA and gene. *Gene* **83**, 39-46
- Haendler B. & Hofer E. (1990) Characterization of the human cyclophilin gene and of related processed pseudogenes. *Eur. J. Biochem.* **190**, 477-482
- Hagner-McWhirter A., Hannesson H.H., Campbell P., Westley J., Roden L., Lindahl U. and Li J.P. (2000) Biosynthesis of heparin/heparan sulfate: kinetic studies of the glucuronyl C5-epimerase with N-sulfated derivatives of the Escherichia coli K5 capsular polysaccharide as substrates. *Glycobiology* **10**, 159-171
- Handschumacher R.E., Harding M.W., Rice J., Drugge R.J. and Speicher D.W. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**, 544-547
- Harding M.W., Handschumacher R.E. and Speicher D.W. (1986) Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **261**, 8547-8555
- Harding M.W. & Handschumacher R.E. (1988) Cyclophilin, a primary molecular target for cyclosporine. Structural and functional implications. *Transplantation.* **46**, 29S-35S
- Harding M.W., Galat A., Uehling D.E. and Schreiber S.L. (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl- prolyl isomerase. *Nature* **341**, 758-760
- Harrison R.K. & Stein R.L. (1990) Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* **29**, 3813-3816
- Harrop H.A. & Rider C.C. (1998) Heparin and its derivatives bind to HIV-1 recombinant envelope glycoproteins, rather than to recombinant HIV-1 receptor, CD4. *Glycobiology* **8**, 131-137
- Hasel K.W. & Sutcliffe J.G. (1990) Nucleotide sequence of a cDNA coding for mouse cyclophilin. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4019
- Hasel K.W., Glass J.R., Godbout M. and Sutcliffe J.G. (1991) An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3484-3491
- Hassel J.R., Robey P., Barrach H-J., Wilczek J., Rennard S.I. and Martin G.R. (1980) Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 4494-4498
- Hayashi K., Madri J.A. and Yurchenco P.D. (1992) Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan. *J. Cell. Biol.* **119**, 945-959
- Helting T. & Roden L. (1969) Biosynthesis of chondroitin sulfate. II. Glucuronosyl transfer in the formation of the carbohydrate-protein linkage region. *J. Biol. Chem.* **244**, 2799-2805

- Herold B.C., Gerber S.I., Polonsky T., Belval B.J., Shaklee P.N. and Holme K. (1995) Identification of structural features of heparin required for inhibition of herpes simplex virus type 1 binding. *Virology* **206**, 1108-1116
- Hesterkamp T., Hauser S., Lutcke H. and Bukau B. (1996) Escherichia coli trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 4437-4441
- Hildebrand A., Romaris M., Rasmussen L.M., Heinegard D., Twardzik D.R., Border W.A. and Ruoslahti E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem. J.* **302**, 527-534
- Hirose J., Kawashima H., Yoshie O., Tashiro K. and Miyasaka M. (2001) Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses. *J. Biol. Chem.* **276**, 5228-5234
- Hocking A.M., Shinomura T. and McQuillan D.J. (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* **17**, 1-19
- Hoffmann K. & Handschumacher R.E. (1995) Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90. *Biochem. J.* **307**, 5-8
- Holloway M.P. & Bram R.J. (1996) A hydrophobic domain of Ca²⁺-modulating cyclophilin ligand modulates calcium influx signaling in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 8549-8552
- Holloway M.P. & Bram R.J. (1998) Co-localization of calcium-modulating cyclophilin ligand with intracellular calcium pools. *J. Biol. Chem.* **273**, 16346-16350
- Hoogewerf A., Kuschert G.S., Proudfoot A.E., Borlat F., Clark-Lewis I., Power C.A. and Wells T.N. (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* **36**, 13570-13578
- Horowitz A., Murakami M., Gao Y. and Simons M. (1999) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate mediates the interaction of syndecan-4 with protein kinase C. *Biochemistry* **38**, 15871-15877
- Horowitz A., Tkachenko E. and Simons M. (2002) Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *J. Cell Biol.* **157**, 715-725
- Houck K.A., Leung D.W., Rowland A.M., Winer J. and Ferrara N. (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* **267**, 26031-26037
- Hovland A.R., La Rosa F.G., Hovland P.G., Cole W.C., Kumar A., Prasad J.E. and Pasard K.N. (1999) Cyclosporin A regulates the levels of cyclophilin A in neuroblastoma cells in culture. *Neurochem. Int.* **35**, 229-235
- Hsu V.L., Heald S.L., Harding M.W., Handschumacher R.E. and Armitage I.M. (1990) Structural elements pertinent to the interaction of cyclosporin A with its specific receptor protein, cyclophilin. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 131-140
- Hsueh Y.P., Yang F.C., Kharazia V., Naisbitt S., Cohen A.R., Weinberg R.J. and Sheng M. (1998) Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulphate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J. Cell Biol.* **142**, 139-151
- Huang G.C. & Zhou J.M. (2000) The two slow refolding processes of creatine kinase are catalysed by cyclophilin. *J. Prot. Chem.* **4**, 285-289
- Humphries D.E., Wong G.W., Friend D.S., Gurish M.F., Qiu W-T., Huang C., Sharpe A.H. and Stevens R.L. (1999) Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* **400**, 769-772
- Husi H. & Zurini M.G. (1994) Comparative binding studies of cyclophilins to cyclosporin A and derivatives by fluorescence measurements. *Anal. Biochem.* **222**, 251-255
- Ibrahim J., Griffin P., Coombe D.R., Rider C.C. and James W. (1999) Cell-surface heparin sulphate facilitates human immunodeficiency virus type 1 entry into some cell lines but not primary lymphocytes. *Virus Res.* **60**, 159-169
- Ihrcke N.S., Parker W., Reissner K.J. and Platt J.L. (1998) Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases. *J. Cell Physiol.* **175**, 255-267

- Ilangumaran S., Borisch B. and Hoessli D.C. (1999) Signal transduction via CD44: role of plasma membrane microdomains. *Leuk Lymphoma*. **35**, 455-469
- Ilangumaran S., He H.T. and Hoessli D.C. (2000) Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins. *Immunol. Today* **21**, 2-7
- Inki P. & Jalkanen M. (1996) The role of syndecan-1 in malignancies. *Ann. Med.* **28**, 63-67
- Inoue T., Yoshida Y., Isaka Y. and Tagawa K. (1993) Isolation of mitochondrial cyclophilin from bovine heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 857-863
- Iozzo R., Cohen I.R., Grässel S. and Murdoch A.D. (1994) The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem. J.* **302**, 625-639
- Iozzo R.V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609-652
- Isacke C.M. & Yarwood H. (2002) The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 718-721
- Ishai-Michaeli R., Eldor A. and Vlodavsky I. (1990) Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. *Cell Regul.* **1**, 833-842
- Ishiguro K., Kadomatsu K., Kojima T., Muramatsu H., Iwase M., Yoshidai Y., Yanada M., Yamamoto K., Matsushita T., Nishimura M., Kusugami K., Saito H. and Muramatsu T. (2001) Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 47483-47488
- Ishihara M., Fedarko N.S. and Conrad H.E. (1987) Involvement of phosphatidylinositol and insulin in the coordinate regulation of proteoglycan sulfate metabolism and hepatocyte growth. *J. Biol. Chem.* **262**, 4708-4716
- Iuliano R., Trapasso F., Sama I., Le Pera I., Martelli M.L., Lembo F., Santoro M., Viglietto G., Chiariotti L. and Fusco A. (2001) Rat protein tyrosine phosphatase eta physically interacts with the PDZ domains of syntenin. *FEBS Lett.* **500**, 41-44
- Ivery M.T. (2000) Immunophilins : switched on protein binding domains ? *Med. Res. Rev.* **20**, 452-484
- Jaakkola P., Vihinen T., Määttä A. and Jalkanen M. (1997) Activation of an enhancer on the syndecan-1 gene is restricted to fibroblast growth factor family members in mesenchymal cells. *Mol. Cell Biol.* **17**, 3210-3219
- Jackson P. (1994) The analysis of fluorophore-labeled glycans by high-resolution polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **216**, 243-252
- Jackson D.G., Bell J.I., Dickinson R., Timans J., Shields J. and 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
- Jackson D.G. (1997) Human leucocyte heparan sulphate proteoglycans and their roles in inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 220-224
- Jacobsson I., Lindahl U., Jensen J.W., Roden L., Prihar H. and Feingold D.S. (1984) Biosynthesis of heparin. Substrate specificity of heparosan N-sulfate D-glucuronosyl 5-epimerase. *J. Biol. Chem.* **259**, 1056-1063
- Jager M. & Pluckthun A. (1997) The rate-limiting steps for the folding of an antibody scFv fragment. *FEBS Lett.* **418**, 106-110
- Jain J., McCaffrey P.G., Valge-Arthur V.E. and Roa A. (1992) Nuclear factor of activated T cells contains fos and jun. *Nature* **356**, 801-804
- Jain J., McCaffrey P.G., Miner Z., Kerppola T.K., Lambert J.N., Verdine G.L., Curran T. and Rao A. (1993) The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and rejection. *Nature* **365**, 352-355
- Jalkanen K., Leu T., Bono P., Salmi M., Jalkanen S. and Smith D.J. (2001) Distinct ligand binding properties of Mac-2-binding protein and mouse cyclophilin [correction of mousephilin] C-associated protein. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3075-3084

- Jin L., Abrahams J.P., Skinner R., Petitou M., Pike R.N. and Carrell R.W. (1997) The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14683-14688
- Jin Z.G., Melaragno M.G., Liao D.F., Yan C., Haendeler J., Suh Y.A., Lambeth J.D. and Berk B.C. (2000) Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ. Res.* **87**, 789-796
- Johnson N., Khan A., Virji S., Ward J.M. and Crompton M. (1999) Import and processing of heart mitochondrial cyclophilin D. *Eur. J. Biochem.* **263**, 353-359
- Johnson P.R. (2001) Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **28**, 233-236
- Jones M., Tussey L., Athanasou N. and Jackson D.G. (2000) Heparan sulfate proteoglycan isoforms of the CD44 hyaluronan receptor induced in human inflammatory macrophages can function as paracrine regulators of fibroblast growth factor action. *J. Biol. Chem.* **275**, 7964-7974
- Kainulainen V., Wang H.M., Schick C. and Bernfield M. (1998) Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J. Biol. Chem.* **273**, 11563-11569
- Kajita M., Itoh Y., Chiba T., Mori H., Okada A., Kinoh H. and Seiki M. (2001) Membrane-type1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J. Cell Biol.* **153**, 893-904
- Kaneider N.C., Reinisch C.M. Dunzendorfer S., Romisch J. and Wiederman C.J. (2002) Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J. Cell Sci.* **115**, 227-236
- Kasinrerk W., Tokrasinwit N. and Phunpae P. (1999) CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. *Immunology* **96**, 184-192
- Kato M., Wang H., Bernfield M., Gallagher J.T. and Turnbull J.E. (1994) Cell surface syndecan-1 on distinct cell types differs in fine structure and ligand binding of its heparan sulfate chains. *J. Biol. Chem.* **269**, 18881-18890
- Kato M., Wang H., Kainulainen V., Fitzgerald M.L., Ledbetter S., Ornitz D.M. and Bernfield M. (1998) Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat. Med.* **4**, 691-697
- 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.M., Zydowsky L.D., Liu J. and Walsh C.T. (1991) Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 9483-9487
- Ke H. (1992) Similarities and differences between human cyclophilin A and other beta-barrel structures. Structural refinement at 1.63 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **228**, 539-550
- Ke H., Mayrose D. and Cao W. (1993) Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of cis-trans isomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3324-3328
- Kern D., Drakenberg T., Wikstrom M., Forsen S., Bang H. and Fischer G. (1993) The cis/trans interconversion of the calcium regulating hormone calcitonin is catalyzed by cyclophilin. *FEBS Lett.* **323**, 198-202
- Kern G., Kern D., Schmid F.X. and Fischer G. (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. and Handschumacher R.E. (1992) Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 5503-5507
- Kieffer L.J., Seng T.W., Li W., Osterman D.G., Handschumacher R.E. and Bayney R.M. (1993) Cyclophilin-40, a protein with homology to the P59 component of the steroid receptor complex. Cloning of the cDNA and further characterization. *J. Biol. Chem.* **268**, 12303-12310
- Kim C., Goldberger O., Gallo R. and Bernfield M. (1994) Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue- and development-specific patterns. *Mol. Cell Biol.* **5**, 797-805

- Kincaid R.L., Takayama H., Billingsley M.L. and Sitkovsky M.V. (1987) Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T lymphocytes and thymocytes. *Nature* **330**, 176-178
- Kinnunen A., Kinnunen T., Kaksonen M., Nolo R., Panula P. and Rauvala H. (1998a) N-syndecan and HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) associate with early axonal tracts in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 635-648
- Kinnunen T., Kaksonen M., Saarinen J., Kalkkinen N., Peng H.B. and Rauvala H. (1998b) Cortactin-Src kinase signalling pathways is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **273**, 10702-10708
- Kinsella L., Chen H-L., Smith J.A., Rudland P.S. and Fernig D.G. (1998) Interactions of putative heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor and its receptor, FGFR-1, with heparin using synthetic peptides. *Glycoconj. J.* **15**, 419-422
- Kirjavainen J., Leppä S., Hynes N.E. and Jalkanen M. (1993) Translational suppression of syndecan-1 expression in Ha-ras transformed mouse mammary epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **4**, 849-858
- Kjellén L. & Lindahl U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443-475
- Koch C., Staffler G., Huttinger R., Hilgert I., Prager E., Cerny J., Steinlein P., Majdic O., Horejsi V. and Stockinger H. (1999) T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *Int. Immunol.* **11**, 777-786
- Koeffler H.P. & Golde D.W. (1980) Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* **56**, 344-350
- Koletsy A.J., Harding M.W. and Handschumacher R.E. (1986) Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J. Immunol.* **137**, 1054-1059
- Koliakos G.G., Kouzi-Koliakos K., Furcht L.T., Reger L.A. and Tsilibary E.C. (1989) The binding of heparin to type IV collagen: domain specificity with identification of peptide sequences from the alpha 1(IV) and alpha 2(IV) which preferentially bind heparin. *J. Biol. Chem.* **264**, 2313-2323
- Kolset S.O. & Gallagher J.T. (1990) Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1032**, 191-211
- Kolset S.O., Mann D.M., Uhlin-Hansen L., Winberg J.O. and Ruoslahti E. (1996) Serglycin-binding proteins in activated macrophages and platelets. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 545-554
- Koopmann W. & Krangel MS. (1997) Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha. *J. Biol. Chem.* **272**, 10103-10109
- Kreis T. & Vale R. (1993) Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins. *Oxford Univ. Press.*, New-York, pp176
- Kresse H., Hausser H., Schonherr E. and Bittner K. (1994) Biosynthesis and interactions of small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycans. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem* **32**, 259-264
- Kroemer G., Zamzami N. and Susin S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**, 44-51
- Krummrei U., Bang R., Schmidtchen R., Brune K. and Bang H. (1995) Cyclophilin A is a zinc-dependent DNA binding protein in macrophage. *FEBS Lett.* **371**, 47-51
- Kung L. & Halloran P.F. (2000) Immunophilins may limit calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus at high drug concentrations. *Transplantation* **70**, 327-335
- Kusche M., Backstrom G., Riesenfeld J., Petitou M., Choay J. and Lindahl U. (1988) Biosynthesis of heparin. O-sulfation of the antithrombin-binding region. *J. Biol. Chem.* **263**, 15474-15484
- Kusche M., Oscarsson L.G., Reynertson R., Roden L. and Lindahl U. (1991) Biosynthesis of heparin. Enzymatic sulfation of pentasaccharides. *J. Biol. Chem.* **266**, 7400-7409
- Kuschert G.S., Hoogewerf A.J., Proudfoot A.E., Chung C.W., Cooke R.M., Hubbard R.E., Wells T.N. and Sanderson P.N. (1998) Identification of a glycosaminoglycan binding surface on human interleukin-8. *Biochemistry* **37**, 11193-11201

- Kuschert G.S, Coulin F., Power C.A., Proudfoot A.E., Hubbard R.E., Hoogewerf A.J. and Wells T.N. (1999) Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* **38**, 12959-12968
- Kuypers D.R., Herlixka A. and Vanrenterghem Y. (2003) Clinical use of rapamycin in renal allograft recipients identifies its relevant toxicity profile and raises unsolved questions : a single-center experience. *Transplant. Proc.* **35**, S138-142
- Lander A. (1999) Seeking the function of cell surface heparin sulphate proteoglycans. In Lander A., Nakato H., Selleck S.B., Turnbull J.E. and Coath C. (eds), *Cell surface proteoglycans in signalling and Development*. Human Frontier Science Program, Strasbourg, pp. 73-87
- Lang K., Schmid F.X. and Fischer G. (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**, 268-270
- Lassalle P., Molet S., Janin A., Heyden J.V., Tavernier J., Fiers W., Devos R. and Tonnel A.B. (1996) ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J. Biol. Chem.* **271**, 20458-20464
- Lau M.M., Stewart C.E., Liu Z., Bhatt H., Rotwein P. and Stewart C.L. (1994) Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev.* **8**, 2953-2963
- Lauri S.E., Kaukinen S., Kinnunen T., Ylinen A., Imai S., Kaila K., Taira T. and Rauvala H. (1999) Regulatory role and molecular interactions of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan (N-syndecan) in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* **19**, 1226-1235
- LeBaron R.G., Zimmermann D.R. and Ruoslahti E. (1992) Hyaluronate binding properties of versican. *J. Biol. Chem.* **267**, 10003-10010
- Lee W.T. & Conrad D.H. (1984) The murine lymphocyte receptor for IgE. II. Characterization of the multivalent nature of the B lymphocyte receptor for IgE. *J. Exp. Med.* **159**, 1790-1795
- Lee M.S., Zhu Y.L., Sun Z., Rhee H., Jeromin A., Roder J. and Dannies P.S. (2000) Accumulation of synaptosomal-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) and other proteins associated with the secretory pathway in GH4C1 cells upon treatment with estradiol, insulin, and epidermal growth factor. *Endocrinology* **141**, 3485-3492
- Legg J.W., Lewis C.A., Parsons M., Ng T. and Isacke C.M. (2002) A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat. Cell Biol.* **4**, 399-407
- Le Hir M., Su Q., Weber L., Woerly G., Granelli-Piperno A. and Ryffel B. (1995) In situ detection of cyclosporin A : Evidence for nuclear localization of cyclosporine and cyclophilins. *Lab. Invest.* **73**, 727-733
- Lesley J., Hyman R., English N., Catterall J.B. and Turner G.A. (1997) CD44 in inflammation and metastasis. *Glycoconj. J.* **14**, 611-622
- Leteux C., Chai W., Nagai K., Herbert C.G., Lawson A.M. and Feizi T. (2001) 10E4 antigen of Scrapie lesions contains an unusual nonsulfated heparan motif. *J. Biol. Chem.* **276**, 12539-12545
- Levy P., Munier A., Baron-Delage S., Di Gioia Y., Gespach C., Capeau J. and Cherqui G. (1996) Syndecan-1 alterations during the tumorigenic progression of human colonic Caco-2 cells induced by human Ha-ras or polyoma middle T oncogenes. *Br. J. Cancer* **74**, 423-431
- Lewis K.A., Gray P.C., Blount A.L., MacConell L.A., Wiater E., Bilezikjian L.M. and Vale W. (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* **404**, 411-414
- Liang M., Haring M., Roughley P.J., Margolis R.K. and Margolis R.U. (1997) Glypican and biglycan in the nuclei of neurons and glioma cells: presence of functional nuclear localization signals and dynamic changes in glypican during the cell cycle. *J. Cell Biol.* **139**, 851-864
- Liao D.F., Jin Z.G., Baas A.S., Daum G., Gygi S.P., Aebersold R. and Berk B.C. (2000) Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 189-196

- Lilie H., Lang K., Rudolph R. and Buchner J. (1993) Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein. Sci.* **2**, 1490-1496
- Lin L.N., Hasumi H. and Brandts J.F. (1988) Catalysis of proline isomerization during protein-folding reactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **956**, 256-266
- Lin D.T. & Lechleiter J.D. (2002) Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J. Biol. Chem.* **277**, 31134-31141
- Lindahl U., Backstrom G., Thunberg L. and Leder I.G. (1980) Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6551-6555
- Lindahl U., Backstrom G. and Thunberg L. (1983) The antithrombin-binding sequence in heparin. Identification of an essential 6-O-sulfate group. *J. Biol. Chem.* **258**, 9826-9830
- Lindahl B. & Lindahl U. (1997) Amyloid-specific heparan sulfate from human liver and spleen. *J. Biol. Chem.* **272**, 26091-26094
- Lindahl U., Kusche-Gullberg M. and Kjellen L. (1998) Regulated diversity of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **273**, 24979-24982
- Lindholm A. (1991a) Therapeutic monitoring of cyclosporine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **41**, 273-281
- Lindholm A. (1991b) Factors influencing the pharmacokinetics of cyclosporin in man. *Ther. Drug Monit.* **13**, 465-477
- Liu J., Albers M.W., Chen C.M., Schreiber S.L. and Walsh C.T. (1990) Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2304-2308
- Liu J., Farmer J.D. Jr., Lane W.S., Friedman J., Weissman I. and Schreiber S.L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815
- Liu J., Shriver Z., Blaiklock P., Yoshida K., Sasisekharan R. and Rosenberg R.D. (1999) Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues. *J. Biol. Chem.* **274**, 38155-38162
- Liu J., Shriver Z., Pope M., Thorp S.C., Duncan M.B., Copeland R.J., Raska C.S., Yoshida K., Eisenberg R.J., Cohen G., Linhardt R.J. and Sasisekharan R. (2002) Characterization of a heparan sulfate octasaccharide that binds to herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *J. Biol. Chem.* **277**, 33456-33467
- Lokeshwar V.B., Iida N. and Bourguignon L.Y.W. (1996) The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **271**, 23853-23864
- Longley R.L., Woods A., Fleetwood A., Cowling G.J., Gallagher J.T. and Couchman J.R. (1999) Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J. Cell. Sci.* **112**, 3421-3431
- Lopez-Casillas F., Cheifetz S., Doody J., Andres J.L., Lane W.S. and Massague J. (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* **67**, 785-795
- Lortat-Jacob H. & Grimaud J.A. (1991) Interferon-gamma C-terminal function : new working hypothesis : heparin sulphate and heparin, new targets for IFN-gamma, protect, relax the cytokine and regulate its activity. *Cell Mol. Biol.* **37**, 253-260
- Lortat-Jacob H., Turnbull J.E. and Grimaud J.A. (1995) Molecular organization of the interferon γ -binding domain in heparin sulphate. *Biochem. J.* **310**, 497-505
- Lortat-Jacob H., Baltzer F. and Grimaud J.A. (1996) Heparin decreases the blood clearance of interferon-gamma and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence. **271**, 16139-16143
- Lowe P.A., Alwyn Clark T.J.H., Davies R.J., Edwards P.R., Kinning T. and Yeung D. (1998) New approaches for the analysis of molecular recognition using the IAsys evanescent wave biosensor. *J. Mol. Recognit.* **11**, 194-199

- Lu Y.F., Tomizawa K., Moriwaki A., Hayashi Y., Tokuda M., Itano T., Hatase O. and Matsui H. (1996) Calcineurin inhibitors, FK506 and cyclosporin A, suppress the NMDA receptor-mediated potentials and LTP, but not depotentiation in the rat hippocampus. *Brain Res.* **729**, 142-146
- Lu P.J., Wulf G., Zhou X.Z., Davies P. and Lu K.P. (1999) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **399**, 784-788
- Luban J., Bossolt K.L., Franke E.K., Kalpana G.V. and Goff S.P. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**, 1067-1078
- Ludwig T., Eggenschwiler J., Fisher P., D'Ercole A.J., Davenport M.L. and Efstratiadis A. (1996) Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. *Dev. Biol.* **177**, 517-535
- Lyon M., Deakin J.A., Mizuno K., Nakamura T. and Gallagher J.T. (1994) Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. *J. Biol. Chem.* **269**, 11216-11223
- Lyon M., Rushton G.R. and Gallagher J.T. (1997) The interaction of transforming growth factor- β with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J. Biol. Chem.* **272**, 18000-18006
- Lyon M. & Gallagher J.T. (1998) Bio-specific sequences and domains in heparan sulphate and the regulation of cell growth and adhesion. *Matrix Biol.* **17**, 485-493
- McCaffrey T.A., Falcone D.J., Brayton C.F., Agarwal L.A., Welt F.G. and Weksler B.B. (1989) Transforming growth factor-beta activity is potentiated by heparin via dissociation of the transforming growth factor-beta/alpha 2-macroglobulin inactive complex. *J. Cell Biol.* **109**, 441-448
- McCaffrey P.G., Luo C., Kerppola T.K., Jain J., Badalian T.M., Ho A.M., Burgeon E., Lane W.S., Lambert J.N., Curran T., Verdine G.L., Rao A. and Hogan P.G. (1993) Isolation of the cyclosporine-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science* **262**, 750-754
- McCaffrey T.A., Falcone D.J., Vicente D., Du B., Consigli S. and Borth W. (1994) Protection of transforming growth factor-beta 1 activity by heparin and fucoidan. *J. Cell Physiol.* **159**, 51-59
- McDonald M.L., Ardito T., Marks W.H., Kashgarian M. and Lorber M.I. (1992) The effect of cyclosporine administration on the cellular distribution and content of cyclophilin. *Transplantation* **53**, 460-466
- Maccarana M., Sakura Y., Tawada A., Yoshida K. and Lindahl U. (1996) Domain structure of heparan sulfates from bovine organs. *J. Biol. Chem.* **271**, 17804-17810
- Mammoto A., Takahashi K., Sasaki T. and Takai Y. (2000) Stimulation of Rho GDI release by ERM proteins. *Methods Enzymol.* **325**, 91-101
- Mani K., Jönsson M., Edgren G., Belting M. and Fransson L.A. (2000) A novel role for nitric oxide in the endogenous degradation of heparan sulfate during recycling of glypican-1 in vascular endothelial cells. *Glycobiology* **10**, 577-586
- Mariller C., Allain F., Kouach M. and Spik G. (1996) Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Biochim. Biophys. Acta.* **1293**, 31-38
- Marks W.H., Harding M.W., Handschumacher R., Marks C. and Lorber M.I. (1991) The immunochemical distribution of cyclophilin in normal mammalian tissues. *Transplantation* **52**, 340-345
- Marks A.R. (1996) Cellular functions of immunophilins. *Physiological Reviews* **76**, 631-649
- Marks R.M., Lu H., Sundaresan R., Toida T., Suzuki A., Imanari T., Hernaiz M.J. and Linhardt R.J. (2001) Probing the interaction of dengue virus envelope protein with heparin: assessment of glycosaminoglycan-derived inhibitors. *J. Med. Chem.* **44**, 2178-2187
- Masy E., Labalette-Houache M. and Dessaint J.P. (1994) Individual susceptibility to cyclosporine: possible involvement of the CD28/CD80 (B7/BB1) pathway. *Transplant. Proc.* **26**, 2846-2848
- Matsuda S., Shibasaki F., Takehana K., Mori H., Nishida E. and Koyasu S. (2000) Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep.* **11**, 248-434

- Meier U., Beier-Hellwig K., Klug J., Linder D. and Beier H.M. (1995) Identification of cyclophilin A from human decidual and placental tissue in the first trimester of pregnancy. *Hum. Reprod.* **10**, 1305-1310
- Merry C.L., Bullock S.L., Swan D.C., Backen A.C., Lyon M., Beddington R.S., Wilson V.A. and Gallagher J.T. (2001) The molecular phenotype of heparan sulfate in the Hs2st^{-/-} mutant mouse. *J. Biol. Chem.* **276**, 35429-35434
- Mi H., Kops O., Zimmermann E., Jäschke A. and Tropschug M. (1996) A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Lett.* **398**, 201-205
- Mikol V., Kallen J. and Walkinshaw M.D. (1994) X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporin complex: comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5183-5186
- Minder D., Böni D.J., Schüpbach J. and Gehring H. (2002) Immunophilins and HIV-1 infection. *Arch Virol.* **147**, 1531-1542
- Mislick K.A. & Baldeschwieler J.D. (1996) Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12349-12354
- Mlynar E., Bevec D., Billich A., Rosenwirth B. and Steinkasserer A. (1997) The non-immunosuppressive cyclosporin A analogue SDZ NIM 811 inhibits cyclophilin A incorporation into virions and virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected primary and growth-arrested T cells. *J. Gen. Virol.* **78**, 825-835
- Modrowski D., Basle M., Lomri A. and Marie P.J. (2000) Syndecan-2 is involved in the mitogenic activity and signaling of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **275**, 9178-9185
- Mondor L., Ugolini S. and Sattentau Q.J. (1998) Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J. Virol.* **72**, 3623-3634
- Montague J.W., Gaido M.L., Frye C. and Cidlowski J.A. (1994) A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity. *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. and 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
- Mulloy B., Forster M.J., Jones C. and Davies D.B. (1993) NMR and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem. J.* **293**, 849-858
- Mulloy B. & Forster M.J. (2000) Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology* **10**, 1147-1156
- Murphy G., Stanton H., Cowell S., Butler G., Knauper V., Atkinson S. and Gavrilovic J. (1999) Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *Apmis* **107**, 38-44
- Nagata T., Kishi H., Liu Q.L., Yoshino T., Matsuda T., Jin Z.X., Murayama K., Tsukada K. and Muraguchi A. (2000) Possible involvement of cyclophilin B and caspase-activated deoxyribonuclease in the induction of chromosomal DNA degradation in TCR-stimulated thymocytes. *J. Immunol.* **165**, 4281-4289
- Najjam S., Gibbs R.V., Gordon M.Y. and Rider C.C. (1997) Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach. *Cytokine.* **9**, 1013-1022
- Nara Y., Kato Y., Torii Y., Tsuji Y., Nakagaki S., Goto S., Isobe H., Nakashima N. and Takeuchi J. (1997) Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican. *Histochem. J.* **29**, 21-30
- Nelimarkka L., Salminen H., Kuopio T., Nikkari S., Ekfors T., Laine J., Pelliniemi L. and Jarvelainen H. (2001) Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **158**, 345-353

- Nestel F.P., Colwill K., Harper S., Pawson T. and Anderson S.K. (1996) RS cyclophilins: identification of an NK-TR1-related cyclophilin. *Gene* **180**, 151-155
- Nichols B.J. & Lippincott-Schwartz J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* **11**, 406-412
- Nichols B.J. (2002) A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* **4**, 374-378
- Nickel W. (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2109-2119
- Nicolli A., Basso E., Petronilli V., Wenger R.M. and Bernardi P. (1996) Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* **271**, 2185-2192
- Nicolson G.L., Nakajima M., Wakabayashi H., Boyd D.D., Diaz D. and Irimura T. (1998) Cancer cell heparanase activity associated with invasion and metastasis. *Adv. Enz. Reg.* **38**, 19-32
- Norgard-Sumnicht K. & Varki A. (1995) Endothelial heparan sulfate proteoglycans that bind to L-selectin have glucosamine residues with unsubstituted amino groups. *J. Biol. Chem.* **270**, 12012-12024
- Nugent M.A. & Edelman E.R. (1992) Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity. *Biochemistry* **31**, 8876-8883
- Oegema T.R., Kraft E.L., Jourdan G.W. and Van Valen T.R. (1984) Phosphorylation of chondroitin sulfate in proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.* **259**, 1720-1726
- Oh E.S., Woods A., Lim S.T., Theibert A.W. and Couchman J.R. (1998) Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate co-ordinately regulate protein kinase C activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 10624-10629
- Ohe Y., Ishikawa K., Itoh Z. and Tatemoto K. (1996) Cultured leptomeningeal cells secrete cerebrospinal fluid proteins. *J. Neurochem.* **67**, 964-971
- Okamoto I., Kawano Y., Matsumoto M., Suga M., Kaibuchi K., Ando M. and Saya H. (1999a) Regulated CD44 cleavage under the control of protein kinase C, calcium influx, and the Rho family of small G proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 25525-25534
- Okamoto I., Kawano Y., Tsuiki H., Sasaki J., Nakao M., Matsumoto M., Suga M., Ando M., Nakajima M. and Saya H. (1999b) CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene* **18**, 1435,1446
- Oravec T., Pall M., Wang J., Roderiquez G., Ditto M. and Norcross M.A. (1997) Regulation of anti-HIV-1 activity of RANTES by heparan sulfate proteoglycans. *J. Immunol.* **159**, 4587-4592
- Otsuka M., Terada Y., Yang T., Nonoguchi H., Tomita K. and Marumo F. (1994) Localization of cyclophilin A and cyclophilin C mRNA in murine kidney using RT-PCR. *Kidney. Int.* **45**, 1340-1345
- Park P.W., Reizes O. and Benfield M. (2000) Cell surface heparin sulphate proteoglycans : selective regulators of ligand-receptor encounters. *J. Biol. Chem.* **275**, 29923-29926
- Park P.W., Pier G.B., Hinkes M.T. and Bernfield M. (2001) Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* **411**, 98-102
- Peattie D.A., Harding M.W., Fleming M.A., Decenzo M.T., Lippke J.A., Livingston D.J. and Benasutti M. (1992) Expression and characterization of human 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
- Peddada L.B., McPherson J.D., Law R., Wasmuth J.J., Youderian P. and Deans R.J. (1992) Somatic cell mapping of the human cyclophilin B gene (PPIB) to chromosome 15. *Cytogenet. Cell. Genet.* **60**, 219-221
- Pelkmans L., Kartenbeck J. and Helenius A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **3**, 473-483
- Pellegrini L., Burke D.F., von Delft F., Mulloy B. and Blundell T.L. (2000) Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* **407**, 1029-1034

- Perrimon N. & Bernfield M. (2000) Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* **404**, 725-728
- Petitou M., Herault J.P., Bernat A., Driguez P.A., Duchaussoy P., Lormeau J.C. and Herbert J.M. (1999) Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects. *Nature* **398**, 417-422
- Petitou M., Casu B. and Lindahl U. (2003) 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. *Biochimie* **85**, 83-89
- Philip A., Hannah R. and O'Connor-McCourt M. (1999) Ectodomain cleavage and shedding of the type III transforming growth factor-beta receptor in lung membranes effect of temperature, ligand binding and membrane solubilization. *Eur. J. Biochem.* **261**, 618-628
- Pikas D.S., LI J.P., Vlodavsky I. and Lindahl U. (1998) Substrate specificity of heparanses from human hepatoma and platelets. *J. Biol. Chem.* **273**, 18770-18777
- Pikas D.S., Eriksson I. and Kjellen L. (2000) Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns. *Biochemistry* **39**, 4552-4558
- Ponta H., Sherman L. and Herrlich P.A. (2003) CD44 : from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 33-45
- Povlsen J.V., Rasmussen A., Madsen M. and Lamm L.U. (1990) Ciclosporin-induced immunosuppression in vitro. II. Variation in sensitivity and binding capacity. *Scand. J. Immunol.* **32**, 45-51
- Price E.R., Zydowsky L.D., Jin M.J., Baker C.H., McKeon F.D. and Walsh C.T. (1991) Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl- prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1903-1907
- Price E.R., Jin M., Lim D., Pati S., Walsh C.T. and McKeon F.D. (1994) Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3931-3935
- Proudfoot A.E., Handel T.M., Johnson Z., Lau E.K., LiWang P., Clark-Lewis I., Borlat F., Wells T.N. and Kosco-Vilbois M.H. (2003) Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 1885-1890
- Pushkarsky T., Zybarth G., Dubrovsky L., Yurchenko V., Tang H., Guo H., Toole B., Sherry B. and Bukrinsky M. (2001) CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6360-6365
- Pye D.A., Vives R.R., Turnbull J.E., Hyde P. and Gallagher J.T. (1998) Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 22936-22942
- Qiu J., Handa A., Kirby M. and Brown K.E. (2000) The interaction of heparan sulfate and adeno-associated virus 2. *Virology* **269**, 137-147
- Quaranta V. (2000) Cell migrate through extracellular matrix : membrane-type metalloproteinases make the way. *J. Cell Biol.* **149**, 1167-1170
- Rabenstein D.L. (2002) Heparin and heparan sulfate : structure and function. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 312-331
- Rahfeld J.U., Rucknagel K.P., Schelbert B., Ludwig B., Hacker J., Mann K. and Fischer G. (1994) 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
- Rahfeld J.U., Rucknagel K.P., Stoller G., Horne S.M., Schierhorn A., Young K.D. and Fisher G. (1996) Isolation and amino acid sequence of a new 22-kDa FKBP-like peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase of *Escherichia coli*. Similarity to Mip-like proteins of pathogenic bacteria. *J. Biol. Chem.* **271**, 22130-22138
- Rahmoune H., Chen H.L., Gallagher J.T., Rudland P.S. and Fernig D.G. (1998a) Interaction of heparin sulphate from mammary cells with acidic fibroblast growth factor (FGF) and basic FGF. Regulation of the activity of basic FGF by high and low affinity binding sites in heparin sulphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 7303-7310

- Rahmoune H., Rudland P.S., Gallagher J.T. and Fernig D.G. (1998b) Hepatocyte growth factor/scatter factor has distinct classes of binding site in heparan sulfate from mammary cells. *Biochemistry* **37**, 6003-6008
- Rapraeger A.C. & Ott V.L. (1998) Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 620-628
- Rapraeger A.C. (2000) Syndecan-regulated receptor signalling. *J. Cell Biol.* **149**, 995-997
- Rapraeger A.C. (2001) Molecular interactions of syndecans during development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 107-116
- Ratajczak T., Carrello A., Mark P.J., Warner B.J., Simpson R.J., Moritz R.L. and House A.K. (1993) The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J. Biol. Chem.* **268**, 13187-13192
- 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
- Rauch U., Gao P., Janetzko A., Flaccus A., Hilgenberg L., Tekotte H., Margolis R.K. and Margolis R.U. (1991) Isolation and characterization of developmentally regulated chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **266**, 14785-14801
- Rauch U., Karthikeyan L., Maurel P., Margolis R.U. and Margolis R.K. (1992) Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J. Biol. Chem.* **267**, 19536-19547
- Rauch U., Feng K. and Zhou X.H. (2001) Neurocan : a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 1842-1856
- Rautava J., Soukka T., Heikinheimo K., Miettinen P.J., Happonen R.P. and Jaakkola P. (2003) Different mechanisms of syndecan-1 activation through a fibroblast-growth-factor-inducible response element (FiRE) in mucosal and cutaneous wounds. *J. Dent. Res.* **82**, 382-387
- Reiss M. & Barcellos-Hoff M.H. (1997) Transforming growth factor-beta in breast cancer : A working hypothesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **45**, 81-95
- Reizes O., Lincecum J., Wang Z., Goldberger O., Huang L., Kaksonen M., Ahima R., Hinkes M.T. Barsh G.S., Rauvala H. and Bernfield M. (2001) Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behaviour by syndecan-3. *Cell* **106**, 105-116
- Rescan P.Y., Loreal O., Hassel J.R., Yamada Y., Guillouzo A. and Clement B. (1993) Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocyte culture. *Am. J. Pathol.* **142**, 199-208
- Rich C.B., Nugent M.A., Stone P. and Foster J.A. (1996) Elastase release of basic fibroblast growth factor in pulmonary fibroblast cultures results in down-regulation of elastin gene transcription. A role for basic fibroblast growth factor in regulating lung repair. *J. Biol. Chem.* **271**, 23043-23048
- Richards F.M., Milner J. and Metcalfe S. (1992) Inhibition of the serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A in lymphocytes: effect on mRNA levels for interleukin-2, IL-2R alpha, krox- 24, p53, hsc70 and cyclophilin. *Immunology* **76**, 642-647
- Rider C.C. (1997) The potential for heparin and its derivatives in the therapy and prevention of HIV-1 infection. *Glycoconj. J.* **14**, 639-642
- Ridley A.J. (2001) Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* **114**, 2713-2722
- Rinfret A., Collins C., Menard R. and Anderson S.K. (1994) The N-terminal cyclophilin-homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both peptidylprolyl cis-trans-isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* **33**, 1668-1673
- Ringvall M., Ledin J., Holmborn K., van Kuppevelt T., Ellin F., Eriksson I., Olofsson A.M., Kjellen L. and Forsberg E. (2000) Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 25926-25930

- Roberts R., Gallagher J., Spooncer E., Allen T.D., Bloomfield F. and Dexter T.M. (1988) Heparan sulphate bound growth factors : a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* **332**, 376-378
- Roderiquez G., Oravec T., Yanagishita M., Bou-Habib D.C., Mostowski H. and Norcross M.A. (1995) Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J. Virol.* **69**, 2233-2239
- Roghani M. & Moscatelli D. (1992) Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J. Biol. Chem.* **267**, 22156-22162
- Rot A. (1992) Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8 : role in neutrophil emigration. *Immunol. Today* **13**, 291-294
- Rosenwirth B., Billich A., Datema R., Donatsch P., Hammerschmid F., Harrison R., Hiestand P., Jaksche H., Mayer P., Paichl P., Quesniaux V., Schatz F., Schuurman H.J., Traber R., Wenger R., Wolff B., Zenke G. and Zurini M. (1994) Inhibition of human immunodeficiency virus replication by SDZ NIM 811, a immunosuppressive of cyclosporin A analog. *Antimicrob. Agents chemother.* **38**, 1763-1772
- Rusnak F. & Mertz P. (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* **80**, 1483-1521
- Rusnati M., Coltrini D., Oreste P., Zoppetti G., Albini A., Noonan D., d'Adda di Fagagna F., Giacca M. and Presta M. (1997) Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J. Biol. Chem.* **272**, 11313-11320
- Rusnati M., Tulipano G., Spillmann D., Tanghetti E., Oreste P., Zoppetti G., Giacca M. and Presta M. (1999) Multiple interactions of HIV-I Tat protein with size-defined heparin oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **274**, 28198-28205
- Rycyzyn M.A., Reilly S.C., O'Malley K. and Clevenger C.V. (2000) Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1175-1186
- Rycyzyn M.A. & Clevenger C.V. (2002) The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6790-6795
- Ryffel B., Woerly G., Greiner B., Haendler B., Mihatsch M.J. and Foxwell B.M. (1991) Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* **72**, 399-404
- Ryffel B. (1993) Cyclosporin binding proteins. Identification, distribution, function and relation to FK binding proteins. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1-12
- Saksela O., Moscatelli D., Sommer A. and Rifkin D.B. (1988) Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J. Cell. Biol.* **107**, 743-751
- Salek-Ardakani S., Arrand J.R., Shaw D. and Mackett M. (2000) Heparin and heparan sulfate bind interleukin-10 and modulate its activity. *Blood* **96**, 1879-1888
- Salmivirta M., Mali M., Heino J., Hermonen J. and Jalkanen M. (1994) A novel laminin-binding form of syndecan-1 (cell surface proteoglycan) produced by syndecan-1 cDNA-transfected NIH-3T3 cells. *Exp. Cell Res.* **215**, 180-188
- Sander B., Brigati C. and Möller E. (1986) Inhibition of in vitro alloreactivity by cyclosporin A: evidence for an inter-individual variation in sensitivity. *Scand. J. Immunol.* **23**, 435-440
- Sanderson R.D. & Bernfield M. (1988) Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: distinct structures on simple and stratified epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 9562-9566
- Sanderson R.D., Lalor P. and Bernfield M. (1989) B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul.* **1**, 27-35
- Sanderson R.D., Hinkes M.T. and Bernfield M. (1992) Syndecan-1, a cell-surface proteoglycan, changes in size and abundance when keratinocytes stratify. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 390-396
- Sanderson R., Turnbull J., Gallagher J. and Lander A.D. (1994) Fine structure of heparan sulfate regulates syndecan-1 function and cell behavior. *J. Biol. Chem.* **269**, 13100-13106
- Sanglier J.-J., Quesniaux V., Fehr T., Hofmann H., Mahnke M., Memmert K., Schuler W., Zenke G., Gschwind L., Maurer C. and Shilling W.J. (1999) Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding

- compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* **52**, 466-473
- Santra M., Mann D.M., Mercer E.W., Skorski T., Calabretta B. and Izzo R.V. (1997) Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J. Clin. Invest.* **100**, 149-157
- Saoncella S., Echtermeyer F., Denhez F., Nowlen J.K., Mosher D.F., Robinson S.D., Hynes R.O. and Goetlinck P.F. (1999) Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 2805-2810
- Saphire A.C., Bobardt M.D. and Gallay P.A. (1999) Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans. *EMBO J.* **18**, 6771-6785
- Saphire A.C., Bobardt M.D., Zhang Z., David G. and Gallay P.A. (2001) Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J. Virol.* **75**, 9187-9200
- Saphire A.C., Bobardt M.D. and Gallay P.A. (2002) Trans-complementation rescue of cyclophilin A-deficient viruses reveals that the requirement for cyclophilin A in human immunodeficiency virus type 1 replication is independent of its isomerase activity. *J. Virol.* **76** (5), 2255-62
- Sarris A.H., Harding M.W., Jiang T.R., Aftab D. and Handschumacher R.E. (1992) Immunofluorescent localization and immunochemical determination of cyclophilin-A with specific rabbit antisera. *Transplantation* **54**, 904-910
- Sasisekharan R. & Venkataraman G. (2000) Heparin and heparan sulfate : biosynthesis, structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 626-631
- Saunders S., Paine-Saunders S. and Lander A.D. (1997) Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain. *Dev. Biol.* **190**, 78-93
- Schall T.J., Bacon K., Toy K.J. and Goeddel D.V. (1990) Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**, 669-671
- Schaller M.D. & Parsons J.T. (1995) pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2635-2645
- Schick B.P. & Senkowski-Richardson S. (1992) Proteoglycan synthesis in human erythroleukaemia (HEL) cells. *Biochem. J.* **282**, 651-658
- Schick B.P., Gradowski J.F. and San Antonio J.D. (2001) Synthesis, secretion, and subcellular localization of serglycin proteoglycan in human endothelial cells. *Blood* **97**, 449-458
- Schlessinger J., Plotnikov A.N., Ibrahim O.A., Eliseenkova A.V., Yeh B.K., Yayon A., Linhardt R.J. and Mohammadi M. (2000) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell.* **6**, 743-750
- Schneider H., Charara N., Schmitz R., Wehrli S., Mikol V., Zurini M.G., Quesniaux V.F. and Movva N.R. (1994) Human cyclophilin C: primary structure, tissue distribution, and determination of binding specificity for cyclosporins. *Biochemistry* **33**, 8218-8224
- Schneuwly S., Shortridge R.D., Larrivee D.C., Ono T., Ozaki M. and Pak W.L. (1989) *Drosophila* ninaA gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporine A binding protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5390-5394
- Scholz C., Schindler T., Dolinski K., Heitman J. and Schmid F.X. (1997) Cyclophilin active site mutants have native prolyl isomerase activity with a protein substrate. *FEBS Lett.* **414**, 69-73
- Schönbrunner E.R. & Schmid F.X. (1992) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase improves the efficiency of protein disulfide isomerase as a catalyst of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4510-4513
- Schreiber S.L. (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* **251**, 283-287
- Schuck P. & Minton A.P. (1996) Analysis of mass transport-limited binding kinetics in evanescent waves biosensors. *Anal. Biochem.* **240**, 262-272

- Schuck P. (1997) Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 541-566
- Sedrani R., Kallen J., Martin Cabrejas L.M., Papageorgiou C.D., Senia F., Rohrbach S., Wagner D., Thai B., Jutzi Eme A-M., France J., Oberer L., Rihs G., Zenke G. and Wagner J. (2003) Sangliferin-cyclophilin interaction : degradation work, synthetic macrocyclic analogues, X-ray crystal structure, and binding data. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3849-3859
- Sehgal S.N., Baker H. and Vezina C.J. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **28**, 721-728
- Seidenbecher C.I., Richter K., Rauch U., Fässler R., Garner C.C. and Gundelfinger E.D. (1995) Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. *J. Biol. Chem.* **270**, 27206-27212
- Selleck S.B. (2000) Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet.* **16**, 206-212
- Sergeant N., Lyon M., Rudland P.S., Fernig D.G. and Delehedde M. (2000) Stimulation of DNA synthesis and cell proliferation of human mammary myoepithelial-like cells by hepatocyte growth factor/scatter factor depends on heparan sulfate proteoglycans and sustained phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p42/44. *J. Biol. Chem.* **275**, 17094-17099
- Sheng M. & Sala C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1-29
- Sherry B., Yarlett N., Strupp A. and Cerami A. (1992) Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3511-3515
- Sherry B., Zybarth G., Alfano M., Dubrovsky L., Mitchell R., Rich D., Ulrich P., Bucala R., Cerami A. and Bukrinsky M. (1998) Role of cyclophilin A in the uptake of HIV-1 by macrophages and T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 1758-1763
- Shi Y., Sahai B.M. and Green D.R. (1989) Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* **339**, 625-626
- Shieh B.H., Stamnes M.A., Seavello S., Harris G.L. and Zuker C.S. (1989) The ninaA gene required for visual transduction in *Drosophila* encodes a homologue of cyclosporin A-binding protein. *Nature* **338**, 67-70
- Shimamoto N. (1999) One-dimensional diffusion of proteins along DNA. Its biological and chemical significance revealed by single-molecule measurements. *J. Biol. Chem.* **274**, 15293-15296
- Shirakata Y., Kobayashi M., Ohtsuka K., Sugano M., Terajima H., Ikai I., Okajima H., Egawa H., Inomata Y., Inamoto T., Tanaka K. and Yamaoka Y. (1995) Inhibitory effect of plasma FKBP12 on immunosuppressive activity of FK506. *Transplantation* **60**, 1582-1587
- Shriver Z., Raman R., Venkataraman G., Drummond K., Turnbull J., Toida R., Linhardt R., Biemann K. and Sasisekharan R. (2000) Sequencing of 3-O sulfate containing heparin decasaccharides with a partial antithrombin III binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 10359-10364
- Shukla D., Liu J., Blaiblock P., Shworak N.W., Bai X.M., Esko J.D., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Rosenberg R.D. and Spear P.G. (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**, 13-22
- Shworak N.W., Liu J., Fritze L.M.S., Schwartz J.J., Zhang L.J., Logeart D. and Rosenberg R.D. (1997) Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* **272**, 28008-28019
- Shworak N.W., Liu J.A., Petros L.M., Zhang L.J., Kobayashi M., Copeland N.G., Jenkins N.A. and Rosenberg R.D. (1999) Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci. *J. Biol. Chem.* **274**, 5170-5184
- Siebertz B., Stocker G., Drzeniek S. Handt S., Just U. and Haubeck H-D. (1999) Expression of glypican-4 in haematopoietic-progenitor and bone-marrow-stromal cells. *Biochem. J.* **344**, 937-943

- Siekierka J.J., Hung S.H., Poe M., Lin C.S. and Sigal N.H. (1989) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* **341**, 755-757
- Silbert J.E. & Freilich L.S. (1980) Biosynthesis of chondroitin sulphate by a Golgi-apparatus-enriched preparation from cultures of mouse mastocytoma cells. *Biochem J.* **190**, 307-313
- Silbert E.J., Bernfield M. and Kokenyesi R. (1997) Proteoglycans: a special class of glycoproteins. *J. Montreuil, J.F.G. Vliegthart and H. Schachter (Eds), Glycoproteins II* pp1-31
- Simons K. & Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572
- Simons K. & Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 31-39
- Simons M. & Horowitz A. (2001) Syndecan-4-mediated signalling. *Cell. Signal.* **13**, 855-862
- Smith T., Ferreira L.R., Hebert C., Norris K. and Sauk J.J. (1995) Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmic reticulum with procollagen into pre-Golgi intermediate vesicles. A role for Hsp47 and cyclophilin B in the export of procollagen from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**, 18323-18328
- Sommer A. & Rifkin D.B. (1989) Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor: protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan. *J. Cell Physiol.* **138**, 215-220
- Song H.H. & Filmus J. (2002) The role of glypicans in mammalian development. *Biochim. Biophys. Acta.* **1573**, 241-246
- Spear P.G. (1993) Entry of alphaherpesviruses into cells. *Semin. Virol.* **4**, 167-180
- Spik G., Haendler B., Delmas O., Mariller C., Chamoux M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Stedman K., Kocher H.P., Keller R., Hiestand P.C. and Movva N.R. (1991) A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J. Biol. Chem.* **266**, 10735-10738
- Spillmann D. & Lindahl U. (1994) Glycosaminoglycan-protein interactions : a question of specificity. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **4**, 677-682
- Spillmann D., Witt D. and Lindahl U. (1998) Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **273**, 15487-15493
- Spillmann D. (2001) Heparan sulfate : anchor for viral intruders ? *Biochimie* **83**, 811-817
- Spring J., Goldberger O.A., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G. and Bernfield M. (1994) Mapping of the syndecan genes in the mouse: linkage with members of the myc gene family. *Genomics* **21**, 597-601
- Stamnes M.A., Shieh B.H., Chuman L., Harris G.L. and Zuker C.S. (1991) The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of Drosophila rhodopsins. *Cell* **65**, 219-227
- Stemmer P.M., Wang S., Krinks M.H. and Klee C.B. (1995) Factors responsible for the Ca²⁺-dependent inactivation of calcineurin in brain. *FEBS Lett.* **374**, 237-240
- Stepkowski S.M. (2003) Preclinical results of sirolimus treatment in transplant models. *Transplant. Proc.* **35**, S219-S226
- Stevens R.L., Otsu K., Weis J.H., Tantravahi R.V., Austen K.F., Henkart P.A., Galli M.C. and Reynolds C.W. (1987) Co-sedimentation of chondroitin sulfate A glycosaminoglycans and proteoglycans with the cytolitic secretory granules of rat large granular lymphocyte (LGL) tumor cells, and identification of a mRNA in normal and transformed LGL that encodes proteoglycans. *J. Immunol.* **139**, 863-868
- Stevens R.L. & Austen K.F. (1989) Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol. Today.* **10**, 381-386
- Stipp C.S., Litwac E.D. and Lander A.D. (1994) Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation. *J. Cell Biol.* **124**, 149-160

- Stoller G., Rucknagel K.P., Nierhaus K.H., Schmid F.X., Fischer G. and Rahfeld J.U. (1995) A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.* **14**, 4939-4948
- Stringer S.E. & Gallagher J.T. (1997) Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparin sulphate. *J. Biol. Chem.* **272**, 20508-20514
- Stringer S.E., Forster M.J., Mulloy B., Bishop C.R., Graham G.J. and Gallagher J.T. (2002) Characterization of the binding site on heparin sulphate for macrophage inflammatory protein 1 alpha. *Blood* **100**, 1543-1550
- Stuhlsatz H.W., Keller R., Becker G., Oeben M., Lennartz L., Fischer D.C. and Greiling H. (1989) Keratan Sulphate : Chemistry, Biology, Chemical Pathology. In H. Greiling and J.E. Scott (Eds.) ; *The Biochemical Society*, London, pp. 1-11
- Stütz A. (1992) Immunosuppressive macrolides. *Transplant. Proc.* **24**, 22-25
- Sugahara K., Ohi Y., Harada T., De Waard P. and Vliegenthart J.F. (1992) Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. I. Six compounds containing 0 or 1 sulfate and/or phosphate residues. *J. Biol. Chem.* **267**, 6027-6035
- Sugahara K. & Kitagawa H. (2000) Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 518-527
- Sugumaran G. & Silbert J.E. (1991) Subfractionation of chick embryo epiphyseal cartilage Golgi. Localization of enzymes involved in the synthesis of the polysaccharide portion of proteochondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* **266**, 9565-9569
- Svensson L., Aszodi A., Reinholt F.P., Fassler R., Heinegard D. and Oldberg A. (1999) Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J. Biol. Chem.* **274**, 9636-9647
- Swanson S.K., Born T., Zydowsky L.D., Cho H., Chang H.Y., Walsh C.T. and Rusnak F. (1992) Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3741-3745
- Syed F., Rycyzyn M.A., Westgate L. and Clevenger C.V. (2003) A novel and functional interaction between cyclophilin A and prolactin receptor. *Endocrine* **20**, 83-89
- Takahashi N., Hayano T. and Suzuki M. (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**, 473-475
- Takeuchi Y., Kodama Y. and Matsumoto T. (1994) Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J. Biol. Chem.* **269**, 32634-32638
- Tanaka Y., Adams D.H., Hubscher S., Hirano H., Siebenlist U. and Shaw S. (1993a) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* **361**, 79-82
- Tanaka Y., Adams D.H. and Shaw S. (1993b) Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol. Today* **14**, 111-115
- Tanaka Y., Fujii K., Hubscher S., Aso M., Takazawa K., Saito T., Ota T. and Eto S. (1998) Heparan sulfate proteoglycan on endothelium efficiently induces integrin-mediated T cell adhesion by immobilizing chemokines in patients with rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum.* **41**, 1365-1377
- Tanaka Y. (2000) T cell integrin activation by chemokines in inflammation. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **48**, 443-450
- Tanveer A., Virji S., Andreeva L., Totty N.F., Hsuan J.J., Ward J.M. and Crompton M. (1996) Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur. J. Biochem.* **238**, 166-172
- Taraktchoglou M., Pacey A.A., Turnbull J.E. and Eley A. (2001) Infectivity of Chlamydia trachomatis serovar LGV but not E is dependent on host cell heparan sulfate. *Infect. Immunol.* **69**, 968-976
- Taub D.D., Conlon K., Lloyd A.R., Oppenheim J.J. and 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

- Tegeder I., Schumacher A., John S., Geiger H., Geisslinger G., Bang H. and Brune K. (1997) Elevated serum cyclophilins levels in patients with severe sepsis. *J. Clinical Immunol.* **17**, 380-386
- Thali M., Bukovsky A., Kondo E., Rosenwirth B., Walsh C.T., Sodroski J. and Gottlinger H.G. (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**, 363-365
- Thompson R.W., Whalen G.F., Saunders K.B., Hores T. and D'Amore P.A. (1990) Heparin-mediated release of fibroblast growth factor-like activity into the circulation of rabbits. *Growth Factors.* **3**, 221-229
- Thompson K. & Rabinovitch M. (1996) Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.* **166**, 495-505
- Tilton B., Andjelkovic M., Didichenko S.A., Hemmings B.A. and Thelen M. (1997) G-Protein-coupled receptors and Fcγ-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 28096-28101
- Tkachenko E. & Simons M. (2002) Clustering induces redistribution of syndecan-4 core protein into raft membrane domains. *J. Biol. Chem.* **277**, 19946-19951
- Tocci M.J., Matkovich D.A., Collier K.A., Kwok P., Dumont F., Lin S., Degudicibus S., Siekierka J.J., Chin J. and Hutchinson N.I. (1989) The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J. Immunol.* **143**, 718-726
- Toida T., Yoshida H., Toyoda H., Koshiishi I., Imanari T., Hileman R.E., Fromm J.R. and Linhardt R.J. (1997) Structural differences and the presence of unsubstituted amino groups in heparan sulphates from different tissues and species. *Biochem. J.* **322**, 499-506
- Trahey M. & Weissman I.L. (1999) Cyclophilin C-associated protein: a normal secreted glycoprotein that down-modulates endotoxin and proinflammatory responses in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3006-3011
- Trenn G., Taffs R., Hohman R., Kincaid R., Shevach E.M. and Sitkovsy M. (1989) Biochemical characterization of the inhibitory effect of CsA on cytolytic lymphocyte effector functions. *J. Immunol.* **142**, 3796-3804
- Tropschug M., Nicholson D.W., Hartl F.U., Köhler H., Pfanner N., Wachter E. and Neupert W. (1988) Cyclosporin A-binding protein (cyclophilin) of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **28**, 14433-14440
- Trybala E., Bergström T., Spillmann D., Svennerholm B., Flynn S.J. and Ryan P. (1998) Interaction between pseudorabies virus and heparin/heparan sulfate. Pseudorabies virus mutants differ in their interaction with heparin/heparan sulfate when altered for specific glycoprotein C heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 5047-5052
- Tumova S. & Bame K.J. (1997) The interaction between basic fibroblast growth factor and heparan sulfate can prevent the in vitro degradation of the glycosaminoglycan by Chinese hamster ovary cell heparanases. *J. Biol. Chem.* **272**, 9078-9085
- Tumova S., Hatch B.A., Law D.J. and Bame K.J. (1999) Basic fibroblast growth factor does not prevent heparan sulphate proteoglycan catabolism in intact cells, but it alters the distribution of the glycosaminoglycan degradation products. *Biochem. J.* **337**, 471-481
- Tumova S., Woods A. and Couchman J.R. (2000) Heparan sulphate proteoglycans on the cell surface : versatile coordinators of cell functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 269-288
- Turley E.A., Noble P.W. and Bourguignon L.Y.W. (2002) Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 4589-4592
- Turnbull J.E., Hopwood J.J. and Gallagher J.T. (1999) A strategy for rapid sequencing of heparan sulfate and heparin saccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 2698-2703
- Turnbull J., Powell A. and Guimond S. (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol.* **11**, 75-82
- Ueno M., Yamada S., Zako M., Bernfield M. and Sugahara K. (2001) Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial

- cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence. *J. Biol. Chem.* **276**, 29134-29140
- Ugolini S., Mondor I. and Sattentau Q.J. (1999) HIV-1 attachment : another look. *Trends Microbiol.* **7**, 144-149
- Uhlrich S., Lagente O., Choay J., Courtois Y. and Lenfant M. (1986) Structure activity relationship in heparin: stimulation of non-vascular cells by a synthetic heparin pentasaccharide in cooperation with human acidic fibroblast growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 728-732
- Vainio S., Lehtonen E., Jalkanen M., Bernfield M. and Saxen L. (1989) Epithelial-mesenchymal interactions regulate the stage-specific expression of a cell surface proteoglycan, syndecan, in the developing kidney. *Dev. Biol.* **134**, 382-391
- Valent Q.A., Kendall D.A., High S., Kusters R., Oudega B. and 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
- van den Born J., Gunnarsson K., Bakker M.A.H., Kjellen L., Kusche-Gullberg M., Maccarana M., Berden J.H.M. and Lindahl U. (1995) Presence of N-unsubstituted glucosamine units in native heparan sulfate revealed by a monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **270**, 31303-31309
- van der Voort R., Taher T.E., Wielenga V.J., Spaargaren M., Prevo R., Smit L., David G., Hartmann G., Gherardi E. and Pals S.T. (1999) Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J. Biol. Chem.* **274**, 6499-6506
- van der Voort R., Keehnen R.M., Beuling E.A., Spaargaren M. and Pals S.T. (2000) Regulation of cytokine signaling by B cell antigen receptor and CD40-controlled expression of heparan sulfate proteoglycans. *J. Exp. Med.* **192**, 1115-1124
- van Duyne G.D., Standaert R.F., Karplus P.A., Schreiber S.L. and Clardy J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.* **229**, 105-124
- van Kuppelvelt T.H., Dennissen M.A.B.A., van Venrooij W.J., Hoet R.M.A. and Veerkamp J.H. (1998) Generation and application of type-specific anti-heparan sulfate antibodies using phage display technology. Further evidence for heparan sulfate heterogeneity in the kidney. *J. Biol. Chem.* **273**, 12960-12966
- Veeraraghavan S., Nall B.T. and Fink A.L. (1997) Effect of prolyl isomerase on the folding reactions of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **36**, 15134-15139
- Venkataraman G., Shriver Z., Raman R. and Sasisekharan R. (1999) Sequencing complex polysaccharides. *Science* **286**, 537-543
- Venkatesan N., Ebihara T., Roughley P.J. and Ludwig M.S. (2000) Alterations in large and small proteoglycans in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 2066-2073
- Veugelers M., De Cat B., Ceulemans H., Bruystens A.M., Coomans C., Durr J., Vermeesch J., Marynen P. and David G. (1999) Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **274**, 26968-26977
- Vives R.R., Pye D.A., Salmivirta M., Hopwoods J.J., Lindahl U. and Gallagher J.T. (1999) Sequence analysis of heparan sulphate and heparin oligosaccharides. *Biochem. J.* **339**, 767-773
- Vlodavsky I., Korner G., Ishai-Michaeli R., Bashkin P., Bar-Shavit R. and Fuks Z. (1990) Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes : possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **9**, 203-226
- Vlodavsky I., Miao H.Q., Medalion B., Danagher P. and Ron D. (1996) Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev.* **15**, 177-186

- Vlodavsky I., Friedmann Y., Elkin M., Aingorn R., Atzmon R., Ishai-Michaeli R., Bitan M., Pappo O., Peretz T., Michal I., Spector L. and Pecker I. (1999) Mammalian heparanase : gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **5**, 793-802
- Vlodavsky I. & Friedmann Y. (2001) Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **108**, 341-347
- Volk R., Schwartz J.J., Li J., Rosenberg R.D. and Simons M. (1999) The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 24417-24424
- Von Ahsen O., Lim J.H., Caspers P., Martin F., Schonfeld H.J., Rassow J. and Pfanner N. (2000) Cyclophilin-promoted folding of mouse dihydrofolate reductase does not include the slow conversion of the late-folding intermediate to the active enzyme. *J. Mol. Biol.* **297**, 809-818
- Wagner L., Yang O.O., Garcia-Zepeda E.A., Ge Y., Kalams S.A., Walker B.D., Pasternack M.S. and Luster A.D. (1998) Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* **391**, 908-911
- Wang B.B., Hayenga K.J., Payan D.G. and Fischer J.M. (1996) Identification of a nuclear-specific cyclophilin which interacts with the proteinase inhibitor eglin c. *Biochem. J.* **314**, 313-319
- Wang Z.Q., Fung M.R., Barlow D.P. and Wagner E.F. (1994) Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted Igf2/Mpr gene. *Nature* **372**, 464-467
- Watanabe K., Yamada H. and Yamaguchi Y. (1995) K-glypican: a novel GPI-anchored heparan sulfate proteoglycan that is highly expressed in developing brain and kidney. *J. Cell Biol.* **130**, 1207-1218
- Webb D.J., Parsons J.T. and Horwitz A.F. (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* **4**, E97-100
- Webb L.M., Ehrenguber M.U., Clark-Lewis I., Baggiolini M. and Rot A. (1993) Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin-8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 7158-7162
- Weigel P.H., Hascall V.C. and Tammi M. (1997) Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem.* **272**, 13997-14000
- Westendorp M.O., Frank R., Ochsenbauer C., Stricker K., Dhein J., Walczak H., Debatin K.M. and Kramer P.H. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **375**, 497-500
- Westling C. & Lindahl U. (2002) Location of N-substituted residues in heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **277**, 49247-49255
- Whitelock J.M., Murdoch A.D., Iozzo R.V. and Underwood P.A. (1996) The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.* **271**, 10079-10086
- Wieggers K., Rutter G., Schubert M., Grattinger M. and Krausslich H.G. (1999) Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid. *Virology* **257**, 261-274
- Wilcox-Adelman S.A., Denhez F. and Goetlinck P.F. (2002) Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 32970-32977
- Wilke M.S. & Furcht L.T. (1990) Human keratinocytes adhere to a unique heparin-binding peptide sequence within the triple helical region of type IV collagen. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 264-270
- Willenbrink W., Halaschek J., Schuffenhauer S., Kunz J. and Steinkasserer A. (1995) Cyclophilin A, the major intracellular receptor for the immunosuppressant cyclosporin A, maps to chromosome 7p11.2-p13: four pseudogenes map to chromosomes 3, 10, 14, and 18. *Genomics* **28**, 101-104
- Wine R.N., Ku W.W., Li L.H. and Chapin R.E. (1997) Cyclophilin A is present in rat germ cells and is associated with spermatocyte apoptosis. Reproductive Toxicology Group. *Biol. Reprod.* **56**, 439-446
- Woodfield K.Y., Price N.T. and Halestrap A.P. (1997) cDNA cloning of rat mitochondrial cyclophilin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1351**, 27-30
- Woods A. & Couchman J.R. (1992) Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J. Cell. Sci.* **101**, 277-290

- Woods A. & Couchman J.R. (1994) Syndecan-4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol. Biol. Cell* **5**, 183-192
- Woods A & Couchman J.R (1998) Syndecans : synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol.* **8**, 189-192
- Woods A. & Couchman J.R. (2000) Integrin modulation by lateral association. *J. Biol. Chem.* **275**, 24233-24236
- Woods A. (2001) Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. *J. Clin. Invest.* **107**, 935-941
- Woods A. & Couchman J.R. (2001) Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 578-583
- Wu Z.L., Zhang L., Beeler D.L., Kuberan B. and Rosenberg R.D. (2002) A new strategy for defining critical functional groups on heparan sulfate. *FASEB J.* **16**, 539-545
- Xia G., Chen J., Tiwari V., Ju W., Li J.P., Malmstrom A., Shukla D and Liu J. (2002) Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-III binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 37912-37919
- Xu Q., Leiva M.C., Fischkoff S.A., Handschumacher R.E. and Lyttle C.R. (1992) Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **267**, 11968-11971
- Yamada H., Watanabe K., Shimonaka M., Yamasaki M. and Yamaguchi Y. (1995) cDNA cloning and the identification of an aggrecanase-like cleavage site in rat brevican. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 957-963
- Yamaguchi Y. & Ruoslahti E. (1988) Expression of human proteoglycan in Chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation. *Nature* **336**, 244-246
- Yamaguchi Y., Mann D.M. and Ruoslahti E. (1990) Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* **346**, 281-284
- Yang H.P., Zhong H.N. and Zhou H.M. (1997) Catalysis of the refolding of urea denatured creatine kinase by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* **1338**, 147-150
- Yayon A., Klagsbrun M., Esko J.D., Leder P. and Ornitz D.M. (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **64**, 841-848
- Yokoi H., Kondo H., Furuya A., Hanai N., Ikeda J.E. and Anazawa H. (1996) Characterization of cyclophilin 40: highly conserved protein that directly associates with Hsp90. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 506-511
- Yoneda A. & Couchman J.R. (2003) Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. *Matrix Biol.* **22**, 25-33
- Yurchenko V., O'Connor M., Dai W.W., Guo H., Toole B., Sherry B. and Bukrinsky M. (2001) CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 786-788
- Yurchenko V., Zybarth G., O'Connor M., Dai W.W., Franchin G., Hao T., Guo H., Hung H.C., Toole B., Gallay P., Sherry B. and Bukrinsky M. (2002) Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J. Biol. Chem.* **277**, 22959-22965
- Yurt R.W., Leid R.W. and Austen K.F. (1977) Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* **252**, 518-521
- Zeng B., MacDonald R., Bann J.G., Beck K., Gambee J.E., Boswell B.A. and Bächinger H.P. (1998) Chicken FK506-binding protein, FKBP65, a member of the FKBP family of peptidylprolyl *cis-trans* isomerases, is only partially inhibited by FK506. *Biochem. J.* **330**, 109-114
- Zenke G., Strittmatter U., Fuchs S., Quesniaux V.F.J., Brinkmann V., Schuler W. Zurini M., Enz A., Billich A., Sanglier J-J. and Fehr T. (2001) Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action. *J. Immunol.* **166**, 7165-7171
- Zhang L., David G. and Esko J.D. (1995) Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan sulfate assembly in proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **270**, 27127-27135

- Zhang L-H. & Liu J.O. (2001) Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle. *J. Immunol.* **166**, 5611-5618
- Zhang L-H., Youn H-D. and Liu J.O. (2001) Inhibition of cell cycle progression by the novel cyclophilin ligand sanglifehrin A is mediated through the NFkappa B-dependent activation of p53. *J. Biol. Chem.* **276**, 43534-43540
- Zhang Y.-J., Hatzioannou T., Zang T., Braaten D., Luban J., Goff S.P. and Bieniasz P.D. (2002) Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type I attachment and infection. *J. Virol.* **76**, 6332-6343