

N° d'ordre : 4089

# THESE

Présentée à

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

Option : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

**Aurélie MELCHIOR**

**Etude de l'activité de la cyclophiline B sur les macrophages:**

- Identification des différentes sous-unités de son récepteur
- Mise en évidence de son activité immunorégulatrice

Soutenance le 12 décembre 2007 devant la commission d'examen :

**Président :** Pr. Hubert HONDERMARCK (Université de Lille1)  
**Rapporteurs :** Pr. Isabelle MARTELLY (Université de Paris XII)  
Dr. Bernhard RYFFEL (Directeur de recherche CNRS, Orléans)  
**Examineurs :** Pr. Liliane GATTEGNO (Université de Paris XIII)  
Dr. Joël MAZURIER (Directeur de recherche CNRS, Lille)  
Pr. Fabrice ALLAIN (Université de Lille1)

N° d'ordre : 4089

# THESE

Présentée à

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

Option : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

**Aurélie MELCHIOR**

**Etude de l'activité de la cyclophiline B sur les macrophages:**

- Identification des différentes sous-unités de son récepteur
- Mise en évidence de son activité immunorégulatrice

Soutenance le 12 décembre 2007 devant la commission d'examen :

**Président :** Pr. Hubert HONDERMARCK (Université de Lille1)  
**Rapporteurs :** Pr. Isabelle MARTELLY (Université de Paris XII)  
Dr. Bernhard RYFFEL (Directeur de recherche CNRS, Orléans)  
**Examineurs :** Pr. Liliane GATTEGNO (Université de Paris XIII)  
Dr. Joël MAZURIER (Directeur de recherche CNRS, Lille)  
Pr. Fabrice ALLAIN (Université de Lille1)

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. F. Allain et du Dr. J. Mazurier au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 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 tiens à adresser quelques mots de remerciements aux personnes qui m'ont aidée dans l'accomplissement de ce travail, que ce soit d'un point de vue purement professionnel que dans la vie de tous les jours.

**Tout d'abord, je remercie vivement les membres du jury,**

Monsieur le professeur HONDERMARCK,  
Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Madame le professeur Isabelle MARTELLY,  
Vous m'avez fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse et je vous adresse toute ma reconnaissance.

Monsieur le docteur Bernhard RYFFEL,  
Je suis sensible à l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. J'espère que vous prendrez plaisir à replonger dans le monde des cyclophilines.

Madame le professeur Liliane GATTEGNO,  
Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous portez à ces travaux et pour avoir accepté de participer à ce jury.

Monsieur le docteur Joël MAZURIER,  
Je vous adresse mes sincères remerciements et ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe et d'avoir accepté la co-direction de cette thèse avec Fabrice.

Monsieur le professeur Fabrice ALLAIN,  
Le dernier et non des moindres ! Fabrice, je ne sais comment te transmettre ma profonde reconnaissance. Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans le temps, la confiance et la patience que tu m'as consacrée. Tu m'as transmis ton expérience et tes compétences à travers l'enthousiasme et la passion qui t'anime. Je te remercie car j'ai pu m'épanouir sur le plan scientifique et humain grâce à la bonne ambiance qui règne dans ton équipe.

**J'adresse également mes remerciements,**

A Agnès,  
Je tiens à t'exprimer ma profonde reconnaissance pour ton encadrement et ton aide dans la réalisation de notre projet Cyclo/macro. Un grand merci également pour ta gentillesse et ton soutien tout au long de ces années. Notre relation m'a beaucoup apportée tant sur le plan scientifique qu'amical.

A Audrey,  
Je te remercie pour ces années partagées au 122. Je te souhaite autant de plaisir que j'en ai eu à travailler dans l'équipe et un avenir plein de réussite.

Cette thèse a bénéficié d'une fructueuse collaboration avec l'équipe du Dr. Guy Lippens que je remercie vivement pour m'avoir aidée et fait découvrir le monde de la RMN des protéines.

A Adeline, Aurélie, Nicolas, Pierre et Marcellin,  
Merci pour ces quelques moments passés à travailler ensemble. Adeline, bon courage pour le DEA. L'année est rude, mais ça vaut la peine de s'accrocher !

Au bureau des étudiants du premier étage,  
Tout d'abord, je remercie Rachel pour ces bons moments passés ensemble à travailler sur le syndécan-1. Un grand merci à Audrey, Esthelle, Marie-Estelle et Stephan pour l'ambiance qui règne dans ce bureau. Nos discussions diverses et variées nous font oublier nos petits soucis de tous les jours. Une réelle amitié et complicité se sont installées. N'est-ce pas, Wilson ? Marie-Estelle et Aurélie D., merci de m'avoir entraînée jusque la salle de sport. Je vous souhaite à tous une bonne continuation et pleins de bonnes choses.

Je remercie toutes les personnes de l'étage pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse. Merci à Mathieu pour nos discussions matinales et à Elisabeth pour ses encouragements. Je remercie également l'ensemble du laboratoire pour son accueil et sa sympathie.

Je tiens enfin à témoigner une reconnaissance particulière à mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes études comme dans tous les moments importants de ma vie. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon affection.

Merci à ma sœur Sophie et à Sébastien, Julie, Fabien et Jules pour leurs encouragements, leur soutien et leur sourire. Vous êtes toujours là pour moi et savez me guider et me reconforter.

A Xavier, que je remercie pour son amour, ses encouragements et sa compréhension. Je reconnais que ce ne doit pas être facile tous les jours de vivre avec une thésarde.

Je remercie également Anne Séverine, Annie Claire, Arno et Lulu... qui ne sont pas scientifiques, mais font des efforts pour me rejoindre dans le monde de la CyPB. Merci pour votre soutien et vos encouragements qui me portent depuis tellement d'années.

Mes derniers mots iront pour ceux qui ne sont plus là aujourd'hui, mais qui m'accompagnent toujours.

# RÉSUMÉ

La cyclophiline B (CyPB) est membre d'une famille de protéines caractérisées par leur capacité à fixer la cyclosporine A et par leur activité prolyl *cis/trans* isomérase. Elle est sécrétée en réponse à des stimuli inflammatoires, induit le chimiotactisme de sous-populations leucocytaires et augmente l'adhérence des lymphocytes T par un mécanisme dépendant des intégrines. Ces propriétés font que la CyPB est maintenant considérée comme un médiateur de la réponse inflammatoire. L'activité de la CyPB est dépendante de son interaction avec deux types de récepteur, le CD147 et les chaînes héparanes sulfates portées par des protéoglycanes membranaires. Sur la base de ces constatations, nous avons entrepris d'identifier le protéoglycane qui sert de co-récepteur à la CyPB. En combinant des expériences de retard sur gel et d'ARN interférence, nous avons montré que seul le syndécan-1 est associé au CD147, et que l'hétérocomplexe est augmenté et/ou stabilisé par la CyPB. L'activité de la CyPB est également dépendante de l'isomérisation d'une liaison prolyle du CD147 et de sa fixation sur un motif héparane sulfate spécifique. Ces interactions permettent l'activation de la voie p44/p42 MAPK et l'adhérence des lymphocytes T et des macrophages. Le CD98 a été décrit comme une protéine régulatrice de l'adhérence cellulaire, par un mécanisme dépendant du CD147. Par des expériences de co-immunoprécipitation et de siRNA, nous avons alors démontré l'implication fonctionnelle du CD98 et de la protéine kinase Cd dans l'adhérence induite par la CyPB. Ces résultats suggèrent qu'en se fixant sur les héparanes sulfates, la CyPB induit l'assemblage d'un complexe activateur des intégrines. Nous avons ensuite étudié les réponses induites par la CyPB dans les cellules THP-1 différenciées en macrophages. Ainsi, en induisant l'expression de MKP-1, une phosphatase décrite comme un régulateur négatif de l'activité des MAPK, la CyPB diminue la production de TNF- $\alpha$  induit par le LPS. Ces résultats sont les premiers à mettre en évidence une activité anti-inflammatoire de la CyPB. En conclusion, nos travaux démontrent que la CyPB est un modulateur de la réponse inflammatoire dont les activités sont dépendantes de sa fixation sur un récepteur complexe composé du syndécan-1, du CD147 et du CD98.

# Abréviations

<b>ADAM</b> : a disintegrin and metalloproteinase	<b>GIPC</b> : gaip-interaction protein C terminus
<b>ADN</b> : acide desoxyribonucleotide	<b>GlcA</b> : acide D-glucuronique
<b>AIF</b> : apoptosis-inducing factor	<b>GlcNAc</b> : N-acétyl-D-glucosamine
<b>ANT</b> : adénine nucléotide translocase	<b>GlcNH<sub>2</sub></b> : glucosamine NH <sub>2</sub> libre
<b>APP</b> : amyloid precursor protein	<b>GlcNS</b> : N-sulfate-D-glucosamine
<b>Arf-6</b> : ADP-ribosylation factor	<b>GM-CSF</b> : granulocyte macrophage-colony stimulating factor
<b>ATF-2</b> : activating transcription factor-2	<b>GPI</b> : glycosylphosphatidyl inositol
<b>BHE</b> : barrière hémato-encéphalique	<b>HAT</b> : heterodimeric amino acid transporters
<b>BSA</b> : bovine sérum albumine	<b>HB-EGF</b> : heparin binding-epidermal growth factor
<b>CAML</b> : calcium-signal regulated cyclophilin ligand	<b>HB-GAM</b> : heparin binding-growth associated molecule
<b>CASK</b> : calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase	<b>HBP</b> : heparin binding protein
<b>CD</b> : cluster of differentiation	<b>HCV</b> : hepatitis C virus
<b>Cdk1/2</b> : cyclin-dependent kinase 1 et 2	<b>HepII</b> : heparin binding domain
<b>c-MET</b> : c-mesenchymal epithelial transition factor	<b>HGF/SF</b> : hepatocyte growth factor/scatter factor
<b>Cn</b> : calcineurine	<b>HIV</b> : human immunodeficiency virus
<b>CoA</b> : Co-enzyme A	<b>HS</b> : héparanes sulfates
<b>CS</b> : chondroïtane sulfate	<b>HSPG</b> : heparan sulfate proteoglycans
<b>CsA</b> : cyclosporine A	<b>HSV</b> : herpes virus simplex
<b>CyCAP</b> : cyclophiline C-associated protein	<b>I-CAM</b> : intracellular adhesion molecule
<b>CyPA, CyPB</b> : cyclophiline A, B	<b>IdoA</b> : acide L-iduronique
<b>DD</b> : death domain	<b>IFN</b> : interferon
<b>dp</b> : degrés de polymérisation	<b>Ig</b> : immunoglobuline
<b>DPBS</b> : dulbecco's phosphate buffered saline	<b>IGF</b> : insulin growth factor
<b>DUSP</b> : DUAL specificity phosphatase	<b>IGF2R</b> : IGF2 receptor
<b>ECL</b> : enhanced chemiluminescence	<b>IL</b> : interleukine
<b>EGF</b> : epidermal growth factor	<b>IP-10</b> : interferon inducible factor-10
<b>ELISA</b> : enzyme linked immunosorbent assay	<b>IRAK</b> : IL-1 receptor associated kinases
<b>EMMPRIN</b> : extracelular matrix metalloproteinase inducer	<b>IRF-3</b> : interferon regulatory factor-3
<b>EphB2</b> : ephrin receptor B2	<b>Itk</b> : interleukin tyrosine kinase
<b>ERK1/2</b> : extracellular signal regulated protein kinase	<b>JNK</b> : c-Jun amino-terminal kinase
<b>FAK</b> : focal adhesion kinase	<b>kDa</b> : kilodalton
<b>FERM</b> : protein 4.1, ezrin, radixin, moesin	<b>LBP</b> : LPS-binding protein
<b>FGF</b> : fibroblast growth factor	<b>LFA-1</b> : leucocyte function-antigen-1
<b>FKBP</b> : FK506 binding protein	<b>LPS</b> : lipolysaccharide
<b>FRAP</b> : FKBP12-rapamycin associated protein	<b>LRR</b> : leucine rich repeat
<b>GAG</b> : glycosaminoglycane	<b>MAGUK</b> : membrane associated guanylate kinase
<b>GAPDH</b> : glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase-3A	<b>MAPK</b> : mitogen activated protein kinase
<b>GEF</b> : guanine nucleotide exchange factor	<b>MAPKK</b> : mitogen activated protein kinase kinase
	<b>MAPKK-K</b> : mitogen activated protein kinase kinase kinase
	<b>MCP-1</b> : monocyte chemoattractant protein-1

**M-CSF** : monocyte-colony-stimulating factor  
**MCT** : monocarboxylates transporters  
**MD-2** : myeloid differentiation protein-2  
**MDR** : multi drug resistance  
**MIP** : macrophage inflammatory protein  
**MKP** : MAPK-phosphatase  
**MMP** : métalloprotéinase  
**MPT** : mitochondrial permeability transition pore  
**MT-MMP** : membrane type-matrix metalloproteinase  
**mTOR** : mammalian target of rapamycin  
**MyD88** : myeloid differentiation factor-88  
**N-CAM** : neural cell adhesion molecule  
**NDST** : héparane sulfate glucosaminyl N-deacétylase/N-sulfotransférase  
**NDV** : Newcastle Disease Virus  
**NF-AT** : nuclear factor of activated T-cell  
**NK-TR** : nuclear killer cell tumor recognition protein  
**NO** : monoxyde d'azote  
**OST** : O-sulfotransférases  
**PAGE** : polyacrylamide gel electrophoresis  
**PAMP** : pathogen-associated molecular pattern  
**PAPS** : adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate  
**PDZ** : postsynaptic density 95, disc large protein, zonula occludens-1  
**PECAM** : platelet/endothelial cell adhesion molecule  
**pHi** : point isoélectrique  
**PI3-K** : phosphatidyl inositol 3 kinase  
**PIP2** : phosphatidyl inositol bisphosphate  
**PI-PLC** : phosphatidyl inositol-phospholipase

**PKC** : protéine kinase C  
**PP1** : protéine phosphatase 1  
**PP2A/2B** : protéine phosphatase 2A/2B  
**PPIase** : peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase  
**RAFT1** : rapamycin and FKBP12 target  
**RANTES** : regulated upon activation normal T cell expressed and secreted  
**Rh1, 2** : rhodopsine 1, 2  
**RMN** : résonance magnétique nucléaire  
**ROK** : rho kinase  
**ROS** : reactive oxygenated species  
**RT-PCR** : reverse transcription polymerase chain reaction  
**SDF** : stromal cell-derived factor  
**SDS** : sodium dodecyl sulfate  
**SFA** : sanghliéférine A  
**SH2** : src-homology domain 2  
**siRNA** : small-interfering RNA  
**SOCS-1** : suppressor of cytokine signaling  
**SVF** : serum de veau foetal  
**TAK** : TGF- $\beta$ -activated kinase  
**TCR** : T-cell receptor  
**TGF- $\beta$**  : transforming growth factor  $\beta$   
**TIA-1** : T-cell intracellular antigen-1  
**TIAR** : TIA-1 related  
**TIR** : toll/IL-1R/R  
**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor- $\alpha$   
**TPR** : tetratricopeptide repeat  
**TRAF6** : TNF-receptor activated factor 6  
**TRIF/TRAM** : TIR domain-containing adaptor inducing IRF-3/TRIF-related adaptor molecule  
**V-CAM** : vascular cell adhesion molecule  
**VEGF** : vascular endothelial growth factor



# Sommaire

---

Introduction .....	1
Généralités .....	4
I. Les Cyclophilines .....	4
<b>A/ Caractérisation des cyclophilines</b> .....	4
A. 1. La cyclophiline A .....	4
A. 2. La cyclophiline B .....	8
A. 3. Les autres membres de la famille des cyclophilines .....	10
<b>B/ Activité peptidyl-prolyle cis/trans isomérase</b> .....	12
B. 1. Isomérisation des liaisons prolyles .....	12
B. 2. Les différentes familles de PPlases .....	13
B. 2.1. <u>Les FK506-Binding Proteins</u> .....	13
B. 2.2. <u>Les Parvulines</u> .....	14
B. 2.3. <u>Le Trigger Factor</u> .....	15
B. 2.4. <u>Une nouvelle classe d'immunophilines, les FCBPs</u> .....	15
<b>C/ Médiateurs cellulaires de l'immunosuppression</b> .....	15
C. 1. Les immunosuppresseurs .....	16
C. 2. Mécanismes moléculaires de l'immunosuppression .....	19
C. 3. Autres activités de la cyclosporine A .....	22
<b>D/ Activités biologiques des cyclophilines</b> .....	24
D. 1. Mécanismes de signalisation .....	24
D. 1.1. <u>Régulation du transport de protéines néosynthétisées</u> .....	24
D. 1.2. <u>Régulation des protéines de signalisation</u> .....	24
D. 1.3. <u>Régulation de l'apoptose</u> .....	26
D. 1.4. <u>Interaction avec le HIV-1</u> .....	27
D. 2. Les cyclophilines extracellulaires .....	28
D. 2.1. <u>Expression des cyclophilines sécrétées lors de l'inflammation</u> .....	28
D. 2.2. <u>Activité chimioattractante</u> .....	29
II. Propriétés des cyclophilines sécrétées .....	30
<b>A/ Caractérisation des sites de fixation</b> .....	31
<b>B/ Le CD147, récepteur de signalisation des cyclophilines</b> .....	32
B. 1. Structure et expression .....	32
B. 2. Le CD147, un inducteur de métalloprotéinases .....	33
B. 3. CD147 et adhérence cellulaire .....	35
B. 4. Le CD147, une protéine régulatrice .....	36
B. 5. Interaction entre les cyclophilines et le CD147 .....	38
<b>C/ Les protéoglycanes membranaires, des récepteurs pour les cyclophilines ?</b> .....	40
C. 1. Les chaînes héparanes sulfates .....	41
C. 1.1. <u>Biosynthèse des chaînes HS</u> .....	42
C. 1.2. <u>Spécificité de reconnaissance</u> .....	45
C. 1.3. <u>Activités associées aux chaînes HS</u> .....	46

C. 2. Structure et fonctions des protéoglycanes membranaires .....	48
C. 2.1. <u>Les syndécans</u> .....	48
a) structure et expression .....	48
b) Fonctions des syndécans .....	51
c) Régulation de l'expression des syndécans .....	59
C. 2.2. <u>Les glypicans</u> .....	60
a) structure et expression .....	60
b) Fonctions des glypicans .....	62
C. 2.3. <u>Le CD44</u> .....	65
a) Structure et expression .....	65
b) Fonctions .....	65
c) Régulation de l'expression du CD44 .....	68
C. 2.4. <u>Le bétaglycan</u> .....	69
C. 3. Interaction entre les HS et les cyclophilines .....	70
<b>D/ Réponses induites par les cyclophilines extracellulaires</b> .....	72
D. 1. Mécanismes de signalisation .....	72
D. 2. Réponses cellulaires .....	73
D. 3. Implication des cyclophilines dans les pathologies inflammatoires .....	74
D. 3.1. <u>La polyarthrite rhumatoïde</u> .....	74
D. 3.2. <u>Autres pathologies inflammatoires</u> .....	76
D. 4. Activité mitogène .....	77
<b>III. Sujet de thèse</b> .....	78
 <b>Travaux Personnels</b>	
<i>Partie I : Etude de l'interaction entre la CyPB et son récepteur membranaire</i>	
I. Identification du protéoglycane présent dans le récepteur de la CyPB .....	80
II. Etude de l'interaction entre les chaînes HS et la CyPB .....	96
III. Participation du CD98 et du CD147 dans l'activation des intégrines par la CyPB .....	119
 <i>Partie II : Mise en évidence de l'activité immunorégulatrice de la CyPB</i>	
I. Mécanismes d'activation et de régulation de l'expression du TNF- $\alpha$ ...	140
<b>A/ Le récepteur du LPS</b> .....	140
A. 1. Le CD14 .....	140
A. 2. Le couple TLR4/MD-2 .....	140
<b>B. Voies de signalisation activées par le récepteur du LPS</b> .....	142
B. 1. Activation des voies de signalisation .....	142
B. 1.1. <u>Voie dépendante de MyD88</u> .....	142
B. 1.2. <u>Voie indépendante de MyD88</u> .....	143
B. 2. Description des voies NF- $\kappa$ B et MAPK .....	143
B. 2.1. <u>Les facteurs de transcription NF-<math>\kappa</math>B</u> .....	143
B. 2.2. <u>Les voies MAPK</u> .....	145

<b>C. Mécanismes de régulation de l'activité du LPS</b> .....	145
C. 1. Modes de régulation de la signalisation .....	145
C. 2. Mécanismes de régulation de l'expression du TNF- $\alpha$ .....	146
C. 2.1. <u>Régulation transcriptionnelle</u> .....	146
C. 2.2. <u>Régulation post-transcriptionnelle</u> .....	146
C. 2.3. <u>Les MAPK phosphatases, des régulateurs de poids des MAPK</u> .....	148
<b>II. La CyPB, une protéine inflammatoire ?</b> .....	149
A. La CyPB, un inducteur de facteurs inflammatoires ? .....	149
B. La CyPB, un modulateur de la réaction inflammatoire ? .....	151
B. 1. La CyPB inhibe l'expression du TNF- $\alpha$ induite par le LPS .....	151
B. 2. Expression d'un régulateur de la transcription du TNF- $\alpha$ , la phosphatase MKP-1 .....	153
B. 3. L'expression de MKP-1 induite par la CyPB est dépendante de l'activation de p44/p42 MAPK .....	154
B. 4. Effet de MKP-1 sur l'activation de la p38 MAPK activée par le LPS ....	155
B. 5. Effet de la CyPB sur les facteurs inflammatoires .....	156
<b>III. Matériel &amp; Méthodes</b> .....	158
<b>Conclusion</b> .....	163
<b>Bibliographie</b> .....	173
<b>Annexe</b> .....	204

# Introduction

---

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe « rôle des protéoglycanes dans la fixation et l'activité des facteurs inflammatoires » dirigée par le Pr. F. Allain et s'inscrit dans la thématique du groupe « Régulation de la réaction inflammatoire et du cancer par les glycoconjugués » dirigée par le Dr. J. Mazurier.

Les cyclophilines forment avec les FKBP (FK506-binding proteins) la grande famille des immunophilines. Elles se caractérisent par leur capacité à fixer un médicament à activité immunosuppressive, la cyclosporine A (CsA) et leur activité peptidylprolyl *cis/trans* isomérase (PPIase). Les premières études se sont focalisées sur le rôle de la cyclophiline A (CyPA) dans l'activité de la CsA. La caractérisation de l'activité PPIase a ensuite suscité de nombreux travaux quant à leur implication dans la mise en conformation des protéines. Depuis, de nombreuses autres fonctions biologiques ont été attribuées aux différentes isoformes de cette famille. Ainsi, la caractérisation de formes sécrétées de CyPA et CyPB dans les milieux biologiques, notamment lors de conditions inflammatoires, a ouvert un nouveau panel de fonctions pour ces protéines. Elles induisent le chimiotactisme de nombreux types cellulaires et la CyPB a la particularité d'induire l'adhérence des lymphocytes T sur la matrice extracellulaire par un mécanisme dépendant de l'activation des intégrines  $\alpha4\beta1$  et  $\alpha4\beta7$ . Etant donné leur implication dans le recrutement de certaines sous-populations leucocytaires, les cyclophilines sécrétées sont désormais considérées comme de nouveaux médiateurs de l'inflammation.

La CyPB se fixe sur les chaînes héparanes sulfates portées par les protéoglycanes membranaires, ce qui lui permet d'être présentée à son récepteur protéique constitué de plusieurs sous-unités dont le CD147. Alors que les chaînes héparanes sulfates sont indispensables pour le chimiotactisme, elles sont essentielles à l'activité pro-adhésive de la CyPB. Sur la base de ces constatations, il nous est apparu essentiel d'estimer la participation du protéoglycane dans les réponses induites par la CyPB et d'identifier si un protéoglycane est spécifiquement impliqué.

La notion de spécificité a aussi été abordée du point de vue du motif héparane sulfate reconnu par la CyPB. La biosynthèse des chaînes héparanes sulfates est un processus complexe et séquentiel qui donne naissance à des motifs « signatures » qui régulent la fixation spécifique de certains ligands. Ces motifs sont définis en fonction de leur taille et de la position des sulfates. Après avoir démontré que la CyPB se fixe sur un octasaccharide, les travaux réalisés dans l'équipe se sont portés plus précisément sur la position des sulfates qui déterminent la spécificité de fixation. Par ailleurs, l'interaction avec les chaînes héparanes

sulfates pourrait être à l'origine d'une modification conformationnelle de la CyPB favorisant son activité. Ainsi, une étude par RMN a été menée en collaboration avec l'équipe de Dr. G. Lippens pour évaluer l'impact de la fixation d'oligosaccharides sur la structure de la CyPB.

L'adhérence des lymphocytes T induite par la CyPB est dépendante de l'activation des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$ . Le mode d'activation de ces intégrines par les récepteurs de la CyPB n'est pas encore identifié. Néanmoins, le CD147 est impliqué dans des phénomènes d'adhérence cellulaire notamment en interagissant avec un autre récepteur membranaire, le CD98. Nos travaux se sont dès lors dirigés sur l'activation des intégrines par la CyPB en se focalisant sur le rôle du CD147 et l'implication fonctionnelle du CD98 dans ce mécanisme.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de la première partie de ma thèse, et a contribué à la publication de 4 articles dans des journaux internationaux.

Dans une optique plus cellulaire et inflammatoire, nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité inflammatoire de la CyPB. Sécrétée en réponse à différents stimuli inflammatoires, la CyPB pourrait jouer un rôle dans la chronicité de certaines pathologies comme l'arthrite rhumatoïde. Elle est libérée massivement par dégradation des protéoglycanes de la matrice extracellulaire, suggérant que les macrophages sont les premières cellules de l'inflammation à « rencontrer » la protéine. Nous avons donc commencé l'étude de nouvelles activités de la CyPB sur les macrophages, ce qui pourrait apporter des informations sur le rôle des cyclophilines dans un contexte inflammatoire.

#### Publications avec comité de lecture

- Rachel Pakula\*, **Aurélie Melchior**\*, Agnès Denys, Christophe Vanpouille, Joël Mazurier and Fabrice Allain (2007) Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis activity. *Glycobiology*, **17**, 492-503.  
\* co-auteurs
- Christophe Vanpouille, Audrey Deligny, Maryse Delehedde, Agnès Denys, **Aurélie Melchior**, Xavier Liénard, Malcom Lyon, Joël Mazurier, David G. Fernig and Fabrice Allain (2007) The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-O-sulfated, N-unsubstituted glucosamine residue. *J. Biol. Chem.*, **282**, 24416-24429
- Xavier Hanouille, **Aurélie Melchior**, Benjamin Parent, Nathalie Sibille, Agnès Denys, Jean-Michel Wieruszkeski, Dragos Horvath, Fabrice Allain, Guy Lippens and Isabelle Landrieu. Structural and functional characterisation of the interaction between cyclophilin B and an heparin derived oligosaccharide. *J. Biol. Chem.*, sous presse

- **Aurélie Melchior**, Agnès Denys, Audrey Deligny, Joël Mazurier and Fabrice Allain. Cyclophilin B induces integrin-mediated adhesion by a mechanism involving CD98-dependant activation of protein kinase C $\delta$  and p44/p42 mitogen-activated protein kinases. En révision dans *Exp. Cell. Res.*

#### Publications sans comité de lecture

- **Aurélie Melchior**, Agnès Denys, Rachel Pakula and Fabrice Allain. (2006) Applications in therapeutic glycomics: example of the cyclophilins as novel inflammatory mediators in rheumatoid arthritis. *New developments in Therapeutic Glycomics*. Eds: Maryse Delehedde and Hugues Lortat-Jacob, **13**, 303-316.

#### Communication orale

- **Aurélie Melchior**, Agnès Denys and Fabrice Allain. La cyclophiline B, un messenger de l'inflammation. *Processus inflammatoire et Pathologies*, 3 novembre 2006, Lille, France.

#### Communication par affiche

- **Aurélie Melchior**, Rachel Pakula, Agnès Denys, Joël Mazurier and Fabrice Allain. *A role for syndecan-1 in cell responses induced by cyclophilin B*. Cytokine/Proteoglycan interactions : biology and structure, 9-10 janvier 2006, Londres, Royaume-Uni.
- **Aurélie Melchior**, Agnès Denys, Joël Mazurier et Fabrice Allain. Rôle de la cyclophiline B dans la migration des macrophages. *VIème Journée André Verbert*, 27 septembre 2006, Lille, France.



# Généralités

---

# I. Les Cyclophilines

Les cyclophilines forment une famille de protéines ubiquitaires, de large distribution phylogénétique et de structure conservée. En effet, de nombreuses isoformes sont décrites chez les mammifères, les plantes jusqu'aux parasites et bactéries. Elles se caractérisent par leur activité peptidyl-prolyle *cis/trans* isomérase (PPIase) et leur capacité à fixer un médicament à activité immunosuppressive, la cyclosporine A (CsA). Bien que structurellement différentes, elles forment avec les FKBP (FK506-binding protein) la famille des immunophilines. Les FKBP partagent avec les cyclophilines ces activités, mais fixent d'autres médicaments immunosuppresseurs, le FK506 et la rapamycine (Schreiber, 1991 ; Ryffel, 1993 ; Galat, 1999 ; 2000).

## A/ Caractérisation des cyclophilines

### A. 1. La cyclophiline A

Premier membre de la famille des cyclophilines à avoir été décrit, la cyclophiline A (CyPA) a été purifiée à partir d'extraits cytosoliques de thymocytes de boeuf par sa capacité à lier la CsA (Handschumacher *et al.*, 1984). La séquence protéique a été réalisée pour l'isoforme bovine par méthode chimique (Harding *et al.*, 1986). L'année suivante, Haendler *et al.* (1987) ont cloné l'ADN complémentaire de la CyPA humaine à partir de la lignée lymphoblastique Jurkat. 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 a 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 et n'est présent qu'en une seule copie dans le génome humain. 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). La CyPA représente 0,1 à 0,4% des protéines totales d'une cellule (Harding *et al.*, 1986). Elle est ubiquitaire avec une abondance particulière 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

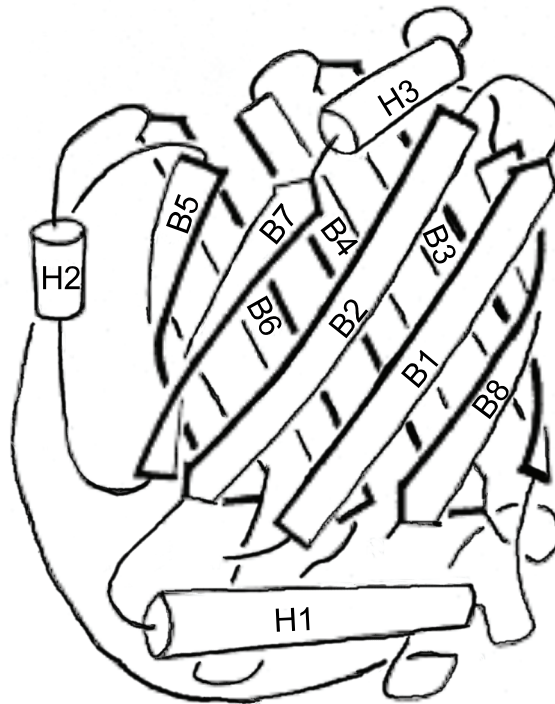
érythrocytes et granulocytes s'accompagne d'une diminution du taux de CyPA, suggérant que les cellules en prolifération ont un taux de CyPA plus élevé que les cellules différenciées. En outre, la CyPA est surexprimée dans tous les tissus néoplasiques (Koletsky *et al.*, 1986) ainsi que dans le placenta 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 avec le médicament présentent 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 comme la concanavaline A entraînent une augmentation du taux de CyPA dans les lymphocytes T. 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, certains auteurs ont décrit sa présence dans d'autres compartiments subcellulaires, comme 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). Cependant, la présence de la CyPA dans ces compartiments est controversée. Montague *et al.* (1994) ont purifié une nucléase calcium-dépendante de 18 kDa impliquée dans des phénomènes apoptotiques dans le noyau de thymocytes de rat traités aux glucocorticoïdes. Cette nucléase, nommée NUC 18 présente de fortes homologies de séquence avec la CyPA. De même, Krummrei *et al.* (1995) ont caractérisé la présence de CyPA dans le noyau de macrophages de souris. Elle se fixerait sur l'ADN en se complexant au zinc et serait alors impliquée dans la modulation de la transcription. Sa localisation nucléaire a enfin été confirmée par microscopie confocale dans la lignée lymphoblastique Jurkat (Le Hir *et al.*, 1995). Sa translocation au noyau jouerait également un rôle dans l'activité de la protéine pRB lors la différenciation neuronale (Lee *et al.* 1999 ; Chiu *et al.* 2003). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'homologue de la CyPA est localisée au niveau du noyau et dans ce cas, elle contrôle la méiose (Arévalo-Rodríguez & Heitman, 2005). Les autres localisations discutées de la CyPA n'ont pas été confirmées, cela s'expliquerait probablement par des réactions croisées dans les expériences d'immuno-détection. Des isoformes de cyclophilines, présentant de fortes homologies de séquence avec la CyPA ont en effet été identifiées dans les compartiments subcellulaires cités précédemment.



Par ailleurs, la CyPA a également été détectée dans différents liquides biologiques bien que son ARNm ne code pas pour un peptide signal capable de diriger la protéine vers l'espace extracellulaire. En effet, elle a été identifiée comme un produit de sécrétion de macrophages murins (Sherry *et al.*, 1992) ou de cellules endothéliales (Kim *et al.* 2004a) en réponse aux lipopolysaccharides (LPS). De plus, 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. Elle a ensuite 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), notamment au niveau des zones riches en macrophages (Kim *et al.*, 2005). La concentration de CyPA retrouvée dans ces milieux biologiques est souvent en relation avec la sévérité de la maladie. D'autres types cellulaires sont à l'origine d'une sécrétion de CyPA, comme les cellules vasculaires de muscles lisses dans les cas de stress oxydatif (Jin *et al.*, 2000), ce qui implique la CyPA dans les pathologies vasculaires telle que l'athérosclérose. Ces observations, suggérant que la CyPA peut être sécrétée dans certaines conditions inflammatoires ou de stress oxydatif, ont été confirmées par Suzuki *et al.* en 2006. En effet, les cellules vasculaires de muscle lisse sécrètent de la CyPA en réponse à un stress oxydatif *via* une voie de transport vésiculaire hautement régulée. Celle-ci implique le remodelage de l'actine et l'activation de la myosine II par un mécanisme dépendant des Rho-GTPase RhoA et Cdc42. L'ensemble de ces données montre que 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-1 et -2 (*fibroblast growth factor*) ou l'IL-1 $\beta$  (*interleukin*), également dépourvues de peptide signal, sont indiscutablement sécrétées (Nickel, 2003).

La conformation de la CyPA, initialement déterminée par diffraction aux rayons X, correspond à l'archétype des cyclophilines. Elle adopte une conformation en tonneau  $\beta$  formé par 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles, délimitant un cylindre dont les ouvertures supérieure et inférieure sont verrouillées par deux hélices  $\alpha$  (Ke *et al.*, 1991 ; 1992). Une troisième hélice de type 3<sub>10</sub>, plus courte, se positionne latéralement par rapport au tonneau  $\beta$ . La conformation de la CyPA présente également de nombreux coudes  $\beta$  qui connectent les hélices et les feuillets  $\beta$  entre eux (Figure 2). 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. Ces extensions leur confèrent des localisations subcellulaires différentes et des fonctions spécialisées.



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

## A. 2. La cyclophiline B

En 1991, une seconde forme de cyclophiline fut décrite, la cyclophiline B (CyPB). En effet, Spik *et al.* (1991) et Caroni *et al.* (1991) ont purifié une forme sécrétée de cyclophiline respectivement à partir du lait de femme et de surnageants de culture de cellules embryonnaires de poulet. La même année, Price *et al.* (1991), Bergsma *et al.* (1991), et Hasel *et al.* (1991) identifiaient une nouvelle forme de cyclophiline par criblage d'une banque d'ADNc issue de cellules lymphoblastiques Jurkat à l'aide d'une sonde oligonucléotidique dérivée de la séquence de la CyPA. L'ARNm de cette nouvelle cyclophiline code pour un peptide signal de 25 acides aminés non retrouvé dans la protéine mature, qui sert à la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique et les vésicules de la voie de sécrétion. Chez l'homme, le gène de la CyPB, présent en une seule copie, est localisé sur le chromosome 15 (Peddada *et al.*, 1992). La CyPB présente 65% d'homologie de séquence avec la CyPA, mais se distingue par la présence d'extrémités N- et C-terminales qui forment chacune un feuillet  $\beta$  (Figure 1) (Price *et al.*, 1991). La protéine mature compte 184 acides

aminés (MM = 21 kDa) et un pHi de 9,6, ce qui lui confère une forte avidité pour les échangeurs de cations comme l'héparine et l'ADN (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). Par ailleurs, 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 un passage de la CyPB depuis la fraction microsomale vers la fraction cytosolique/nucléaire dans des thymocytes activés par des anticorps anti-CD3. Dans les cellules à forte activité sécrétoire, elle est retrouvée le long de la voie de sécrétion (Smith *et al.*, 1995) et dans les liquides biologiques, comme le lait de femme, le plasma (Spik *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995) et les surnageants de milieux de culture (Caroni *et al.*, 1991 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; De Ceuninck *et al.*, 2003). Par méthode ELISA, la concentration plasmatique de la CyPB a été estimée à  $150 \pm 80$  ng/ml ( $7 \pm 4$  nM) (Allain *et al.*, 1995). La CyPB est sécrétée soit de façon constitutive par certaines cellules comme les fibroblastes et les chondrocytes en culture (Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; De Ceuninck *et al.*, 2003), soit en réponse à un stress oxydatif par des cellules vasculaires du muscle lisse (Liao *et al.*, 2000).

Les mécanismes de rétention de la CyPB dans le réticulum endoplasmique ou de sécrétion ne sont pas clairement établis. 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 VEKPF~~A~~IAKE (Arber *et al.*, 1992). En effet, 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 AIAKE. Ces travaux suggèrent 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). Comme la CsA se fixe au noyau central des cyclophilines, il apparaît que la partie

C-terminale de la CyPB n'explique pas à elle seule sa rétention dans le réticulum endoplasmique (Hsu *et al.*, 1990).

### **A. 3. Les autres membres de la famille des cyclophilines**

La cyclophiline C (CyPC) a été clonée pour la première fois à partir d'une banque d'ADNc de cellules stromales de moelle épinière de souris. Cet ARNm est présent en grande quantité dans le rein. À l'inverse, de faibles taux sont détectables dans la rate, les lymphocytes B et T. Elle est constituée de 212 acides aminés (MM = 22,8 kDa) et possède un pHi égal à 7,4 (Friedman & Weissman, 1991). 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  $\beta$  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).

Comme pour ses homologues, son expression est fortement augmentée en conséquence du traitement à la CsA, suggérant un rôle de cette protéine dans la néphrotoxicité induite par le médicament (Friedman & Weissman, 1991 ; Otsuka *et al.*, 1994). Il a été décrit plus tard que contrairement à son isoforme murine, son expression humaine ne se limitait pas au rein. Ces constatations sont en contradiction avec l'hypothèse de son implication dans la néphrotoxicité du médicament chez l'homme. En effet, l'ARNm de la CyPC fut 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 encore moins représentée dans le cerveau et les cellules lymphoblastiques Jurkat. La CyPC interagit spécifiquement avec une glycoprotéine transmembranaire de 574 acides aminés (MM = 77 kDa), la CyCAP (*CyPC-associated protein*) (Freidman & Weissman, 1991). Les études réalisées sur la CyCAP démontrent son implication dans la régulation de phénomènes liées à l'inflammation (Trahey & Weissman, 1999 ; Jalkanen *et al.*, 2001). Les souris déficientes en CyCAP sont plus sensibles aux endotoxines bactériennes comme le LPS et surexpriment des cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) et l'IL-12 (Trahey & Weissman, 1999).

La cyclophiline D (CyPD ou hCyP3) a été isolée suite au 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). Elle possède respectivement 76% et 62% d'homologie avec la CyPA



et la CyPB (Figure 1). Son ARNm code pour une protéine de 207 acides aminés (MM = 22 kDa). Toutefois, la CyPD isolée a une masse effective de 18 kDa. Cette différence de poids moléculaire est due à la présence d'un peptide signal à l'origine de la localisation de la protéine dans 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.

La cyclophiline 40 (CyP40) est une seconde cyclophiline cytosolique. Isolée par chromatographie d'affinité sur CsA immobilisée à partir d'un homogénat de cerveau de veau, elle existe sous deux isoformes comme la CyPA. Toutefois, celles de la CyP40 ont des points isoélectriques acides (5,3 et 5,5), ce qui contraste avec les pI basiques décrits pour les autres cyclophilines (Kieffer *et al.*, 1992). L'ADNc de la CyP40 code pour une protéine de 370 acides aminés composée de plusieurs domaines. Son domaine N-terminal présente 64% d'homologie de séquence avec la CyPA, et porte le site PPIase et celui de fixation de la CsA. En revanche, son domaine C-terminal possède 30% d'homologie 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 l'Hsp90 par leurs domaines TPR et sont associées à la forme inactive des récepteurs stéroïdiens (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 tissu humain 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).

Parallèlement à ces isoformes, d'autres cyclophilines, qualifiées de mineures ont été décrites. Les cyclophilines 33 et 60 (CyP33 et CyP60) sont des isoformes nucléaires avec une large distribution tissulaire (Mi *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 1996). La CyP33 se fixe à l'ARN par son domaine N-terminal alors que son domaine C-terminal porte l'activité PPIase et présente 40% d'homologie de séquence avec la CyPA. Récemment, la CyP60 a été impliquée dans le transport du CD147 à la membrane plasmique (Yurchenko *et al.*, 2005 ; Pushkarsky *et al.*, 2005).

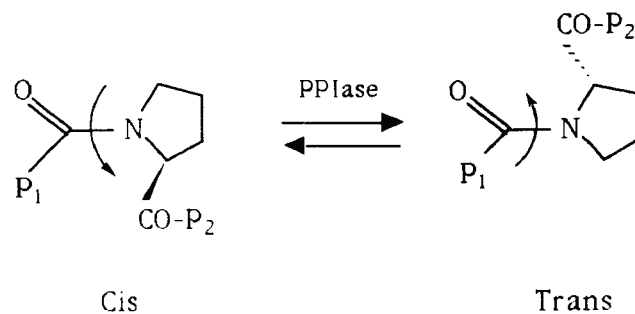
Il existe également des formes membranaires de cyclophilines. Le produit du gène *nina A* de *Drosophila melanogaster* code pour une protéine de 237 acides aminés qui partage

42% d'homologie avec la CyPA. Cette isoforme est essentiellement exprimée dans les cellules photoréceptrices où elle serait impliquée dans la stabilité ou le transport des rhodopsines Rh1 et Rh2 des photorécepteurs R1-R6 (Schneuwly *et al.*, 1989 ; Shieh *et al.*, 1989). L'ancrage de *nina A* dans la membrane, permet de diriger le domaine cyclophiline vers la lumière du réticulum, ce qui permettrait de mettre en conformation les protéines Rh1 et Rh2. Enfin, le NK-TR (*natural killer cell-tumour recognition*) est une protéine membranaire de 150 kDa présente sur les cellules NK, certains lymphocytes T et les monocytes activés. Il est composé de plusieurs domaines dont l'un d'entre eux présente 50% d'homologie avec la CyPA (Anderson *et al.*, 1993). La même équipe a également mis en évidence la RS-Cyclophiline qui possède 39% d'homologie avec le NK-TR. Elle est cytosolique, de large distribution tissulaire et porte un domaine cyclophiline possédant 70% d'homologie de séquence avec la CyPA (Nestel *et al.*, 1996).

## B/ Activité peptidyl-prolyle *cis/trans* isomérase

### B. 1. Isomérisation des liaisons prolyles

Les peptidyl-prolyle *cis/trans* isomérases, encore appelées rotamases sont capables de catalyser l'isomérisation des liaisons peptidiques entre un résidu d'acide aminé et celui d'une proline (Figure 3). En effet, cette liaison se retrouve majoritairement en conformation *cis* à la différence des autres liaisons. L'absence de proton sur la fonction amine du résidu de proline empêche la formation des structures secondaires comme les hélices  $\alpha$  et les feuilletts  $\beta$  (Galat & Metcalfe, 1995). Le passage à la conformation *trans* constitue un événement moléculaire lent, mais essentiel au repliement des protéines, ce qui explique l'intervention d'enzymes spécialisées. En effet, les PPIases accélèrent *in vitro* l'isomérisation de peptides de synthèse ainsi que les étapes lentes de repliement des protéines (Fischer *et al.*, 1984 ; 1989 ; Lang *et al.*, 1987).



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

A la différence de la plupart des réactions enzymatiques, dans celle-ci, aucune liaison covalente n'est rompue, ni établie. L'isomérisation de la liaison prolyle reposerait sur une diminution transitoire de son caractère de double liaison. Initialement, l'activité PPIase *in vitro* se mesurait selon une méthode spectrophotométrique décrite par Fischer *et al.* (1984). Désormais, cette analyse se fait par RMN (Hübner *et al.*, 1991) ou par technique fluorimétrique (García-Echeverría *et al.*, 1993). La RMN a d'ailleurs permis de montrer que l'isomérisation était plus complexe qu'un simple échange entre les formes et nécessitait le passage par un conformère presque plan stabilisé par l'enzyme.

## **B. 2. Les différentes familles de PPIases**

Dès 1989, Fischer *et al.* et Takahashi *et al.* ont mis en évidence l'activité PPIase des cyclophilines *in vitro*. 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 jouent un rôle crucial dans la mise en conformation des protéines néosynthétisées *in vivo* (Lang *et al.*, 1987 ; Ivery *et al.*, 2000). Le domaine catalytique est porté par la partie conservée de ces protéines. La fixation de la CsA inhibe cette activité, expliquant que le site de fixation à la CsA recouvre le site enzymatique. Les cyclophilines ne semblent pas accorder d'importance à la nature du résidu aminé précédant la proline. L'ensemble des PPIases est regroupé en deux familles principales : les cyclophilines et les FKBP, et en deux familles secondaires, les parvulines et le Trigger Factor.

### **B. 2.1. Les FK506-Binding Proteins**

Les FKBP constituent la deuxième grande famille des immunophilines. Elles n'ont pas d'homologie de séquence avec les cyclophilines, mais présentent une activité PPIase *in vitro* et fixent des immunosuppresseurs. En effet, elles ont été initialement caractérisées par leur capacité à interagir avec une grande affinité ( $K_d = 0,2$  à  $1$  nM) avec des immunosuppresseurs de type macrolide, le FK506 et la rapamycine (Fretz *et al.*, 1991). Comme pour les cyclophilines, la liaison de ces drogues inhibe l'activité PPIase. Par contre, les substrats de cette activité sont différents selon la famille de protéines. Alors que les cyclophilines ne semblent pas avoir de spécificité de substrat, ceux des FKBP doivent contenir en effet un acide aminé hydrophobe précédant le résidu de proline (Harrison & Stein, 1990).

Comme pour les cyclophilines, de nombreuses protéines ont été classées dans la famille des FKBP en raison de leurs fortes homologies de séquence, notamment au niveau du

site enzymatique (Kay, 1996 ; Galat, 2000). Les FKBP se répartissent en deux classes : 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, modèle de base des FKBP, est une protéine cytoplasmique ubiquitaire, présente en fortes concentrations, surtout au niveau du cerveau (Siekerka *et al.*, 1989 ; Harding *et al.*, 1989). Elle est formée de 5 feuillets  $\beta$  encadrant une courte hélice  $\alpha$  (Van Duyne *et al.*, 1993). Elle interagit avec deux types de récepteurs intracellulaires associés à la libération de calcium : les récepteurs à ryanodine et les récepteurs à inositol 1, 4, 5-triphosphate (Marks *et al.*, 1996). Elle a aussi pour fonction d'empêcher l'activation anarchique du récepteur de type I du TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) en se fixant à sa partie intracytoplasmique (Wang *et al.*, 1996, Wang & Donahoe, 2004). Une forme extracellulaire de FKBP12 a été décrite bien que son ARNm ne code pas pour un peptide de sécrétion. Comme pour les cyclophilines A et B, la FKBP12 pourrait être sécrétée en réponse à des stimuli inflammatoires (Bang *et al.*, 1995 ; Shirakata *et al.*, 1995).

L'inhibition de l'activité PPIase par des analogues non immunosuppresseurs de CsA pour les cyclophilines ou de rapamycine pour les FKBP a peu de conséquence sur la survie ou la croissance des cellules de mammifères (Bierer *et al.*, 1990a ; Sigal *et al.*, 1991). En outre, l'inactivation des gènes codants pour les homologues de cyclophilines ou de FKBP chez la levure n'affecte pas la viabilité cellulaire (Heitman *et al.*, 1991 ; Koltin *et al.*, 1991 ; Koser *et al.*, 1991 ; Dolinski *et al.*, 1997). Ces données suggèrent que ces enzymes ne sont pas essentielles au métabolisme basal de la cellule. Toutefois, elles semblent importantes pour la croissance en milieu minimal (Gothel *et al.*, 1998). Chez *Escherichia coli*, l'homologue SurA permet la formation du pili, un organe essentiel à la bactérie pour coloniser le tractus urinaire (Justice *et al.*, 2005).

### B. 2.2. Les Parvulines

La première parvuline fut identifiée chez *Escherichia coli*. Il s'agit d'une petite protéine (MM = 10,1 kDa) ne présentant aucune homologie structurale avec les cyclophilines et les FKBP (Rahfeld *et al.*, 1994 ; Rahfeld *et al.*, 1996 ; Scholz *et al.*, 1997). A ce jour, aucun ligand à activité immunosuppressive n'a été identifié. En revanche, ces protéines présentent une activité enzymatique comparable à celles des autres PPIases (Fischer, 1996). Chez l'homme, des protéines homologues à la parvuline de *E. coli* ont également été isolées. Pin1 a la particularité d'isomériser des motifs spécifiques non reconnus par les autres PPIases. Elle 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. Après liaison à ces motifs, elle induit le changement de conformation de la liaison grâce à son activité PPIase. Elle est impliquée dans la régulation de mécanismes phospho/déphospho. Ces mécanismes régulent le cycle cellulaire, dont la dérivation pathologique conduit au développement de cancers (Lu *et al.*, 1996 ; Lu *et al.*, 1999). Pin1 est également impliquée dans la maladie d'Alzheimer où elle interagit avec les protéines Tau et le précurseur de la protéine amyloïde (APP), dont le défaut d'isomérisation participerait à la pathologie (Balastik *et al.*, 2007).

### B. 2.3. Le Trigger Factor

Le Trigger Factor, membre unique de cette dernière famille de PPIase a été isolé en association avec la sous-unité 50S du ribosome d'*E. Coli*. Il a une masse de 58 kDa et une spécificité de substrat proche de celle des FKBP. Stoller *et al.* (1995) ont par ailleurs démontré que son activité enzymatique est supérieure à celle estimée pour les cyclophilines et les FKBP. En revanche, cette activité enzymatique n'est pas inhibée par la liaison d'immunosuppresseurs (Stoller *et al.*, 1995). Sa colocalisation avec les ribosomes suggèrent son implication dans le repliement des protéines en cours de traduction (Valent *et al.*, 1995 ; Hesterkamp *et al.*, 1996).

### B. 2.4. Une nouvelle classe d'immunophilines, les FCBPs

Récemment, une nouvelle famille d'immunophilines a été caractérisée. Ces protéines ont la particularité d'être constituées à la fois de domaines cyclophiline et FKBP reliés par un domaine TPR. Dénommées les FCBPs pour *FKBP and cyclophilin binding proteins*, elles ont été pour le moment décrites chez trois protozoaires dont *Toxoplasma gondii* et deux bactéries. Elles présentent donc une double activité PPIase qui leur permettrait d'interagir avec des protéines spécifiques qui ne seraient pas recrutées si les domaines étaient portés par deux immunophilines différentes (Barik, 2006).

## **C/ Médiateurs cellulaires de l'immunosuppression**

La réponse immunitaire est essentielle à l'organisme pour le protéger des agressions extérieures. Néanmoins, cette réponse doit être contrôlée lors de certaines pathologies inflammatoires et dans les cas de greffes. À l'origine, les traitements anti-rejet utilisés étaient les corticostéroïdes et l'azathioprine, mais leur efficacité était limitée. L'utilisation clinique de

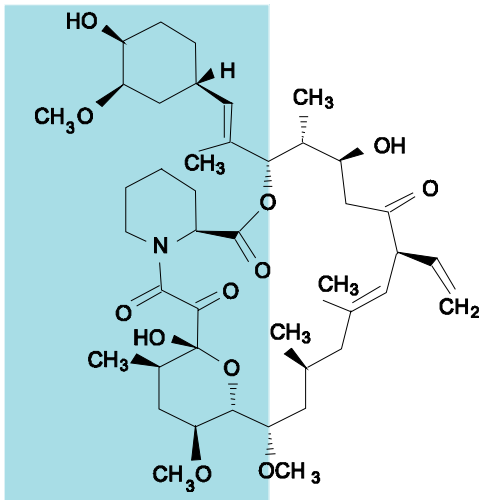
la CsA a permis d'améliorer considérablement le résultat des transplantations et d'élargir le champ des possibilités dans ce domaine.

### **C. 1. Les immunosuppresseurs**

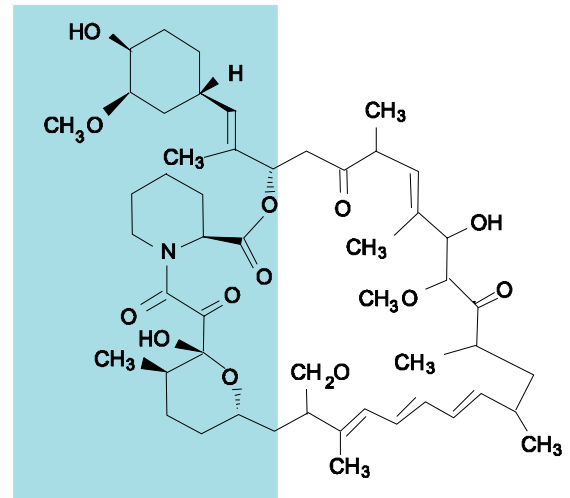
La CsA a été isolée à partir d'une souche de champignon inférieur, le *Tolypocladium inflatum*, par le laboratoire Sandoz en 1969 (Borel *et al.*, 1976). C'est un undécapeptide cyclique hydrophobe de masse moléculaire de 1203 Da (Figure 4). Les premiers essais cliniques ont mis en évidence sa puissante activité immunosuppressive. Elle est largement utilisée dans les thérapies de prévention de rejet de greffe et dans les traitements de certaines maladies auto-immunes, telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète insulino-dépendant et les uvéites. Son mode d'action repose sur sa capacité à bloquer la production et la libération de cytokines par les lymphocytes T auxiliaires et notamment l'expression de l'IL-2 responsable de l'expansion clonale (Borel *et al.*, 1989). C'est pourquoi elle est encore le médicament immunosuppresseur le plus utilisé.

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). A la différence des autres protéines formées d'un tonneau  $\beta$ , la CsA ne se fixe pas aux cyclophilines à l'intérieur du cylindre formé par le tonneau mais à la surface de celui-ci au niveau d'une poche hydrophobe (Figure 5) (Hsu *et al.*, 1990).

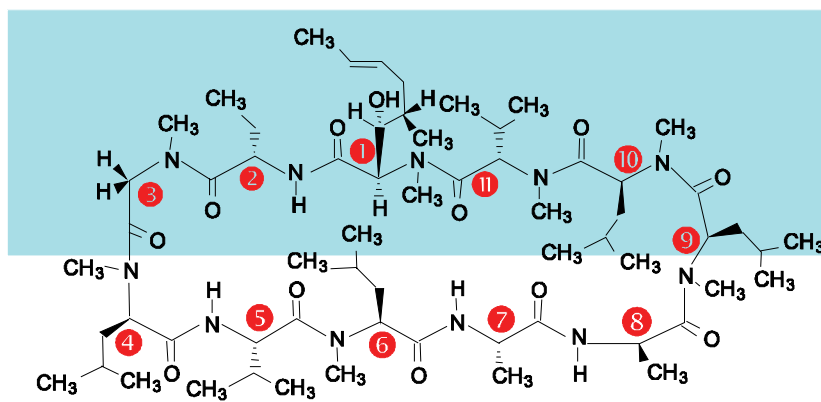
La CsA diffuse rapidement dans l'organisme. Toutefois, sa concentration dans le cerveau est inférieure à celle du sang, suggérant que la CsA traverse difficilement la barrière hémato-encéphalique. Dans le sang, la majorité de la CsA (60%) se retrouve piégée au niveau des hématies. Seuls 5% de la fraction de CsA sanguine sont associés aux lymphocytes. Cette fraction semble négligeable, mais elle est à l'origine de l'activité immunosuppressive (Lindholm, 1991a ; 1991b ; Barre, 1992). En outre, la concentration en CsA dans les cellules mononuclées est mille fois supérieure à celles des érythrocytes. L'efficacité thérapeutique du médicament peut varier en fonction du type de transplantation et de son ancienneté. Des études cliniques ont montré une variabilité intra- et inter-individuelle (Sander *et al.*, 1986 ; Povlsen *et al.*, 1990 ; Masy *et al.*, 1994). La drogue présente des effets secondaires, notamment une néphrotoxicité. Les doses sont adaptées en fonction de chaque patient car la limite entre dose efficace et toxicité est très faible. Toutefois, *in vitro* 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).



FK506

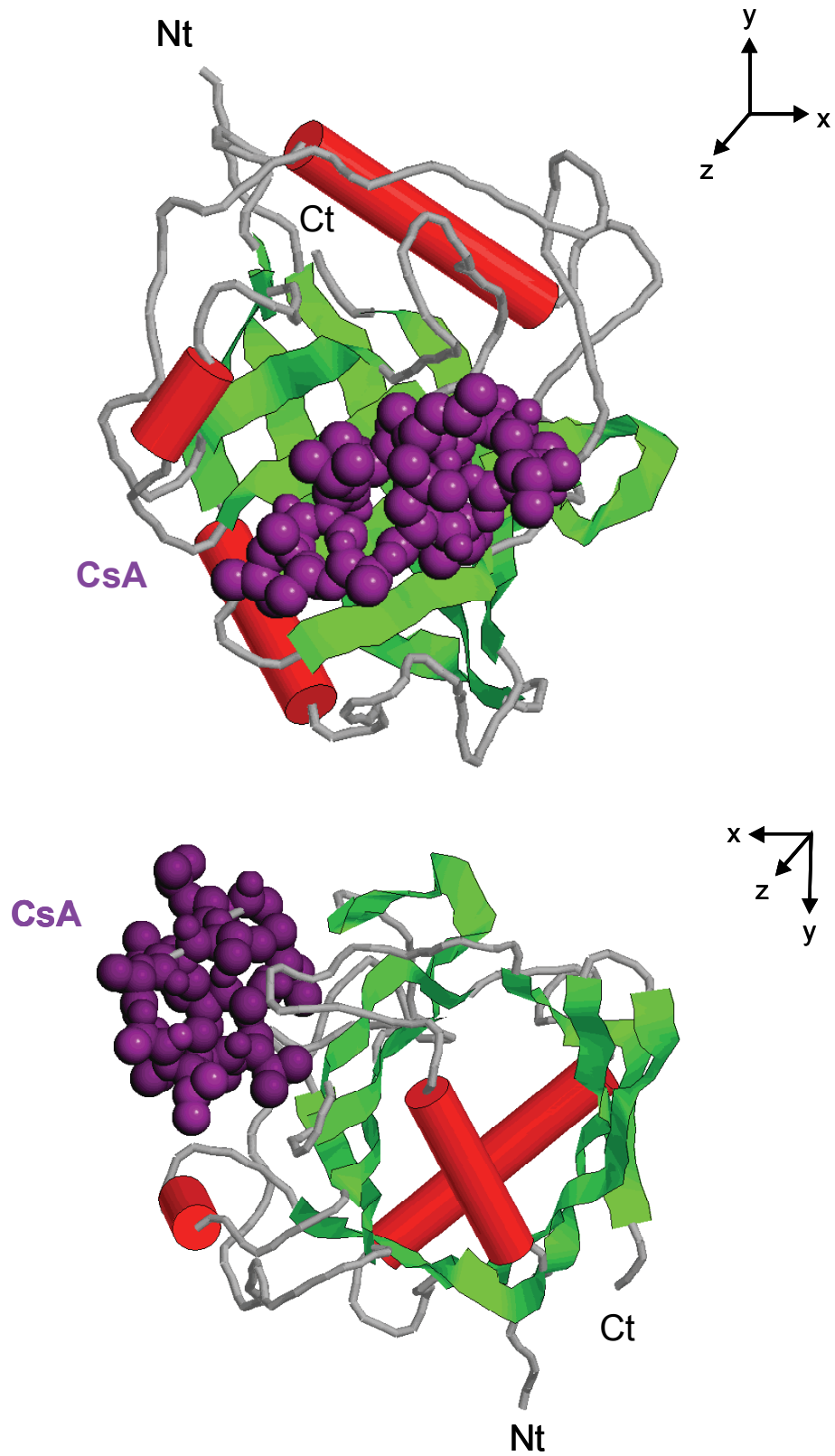


Rapamycine



Cyclosporine A

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



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



Les études réalisées sur la CsA ont conduit à la découverte d'autres molécules immunosuppressives, le FK506 et la Rapamycine, des macrolides de types lactone (figure 4). Le FK506 a été isolé à partir d'une culture de *Streptomyces tsukubaiensis* (Stutz, 1992) alors que la rapamycine a été identifiée à l'origine comme un antifongique produit par *Streptomyces hygroscopicus* (Shegal *et al.*, 1975). Bien que de structure différente de la CsA, le FK506 a une activité immunosuppressive équivalente en ciblant l'activation lymphocytaire. En revanche, la rapamycine bloque la prolifération lymphocytaire induite par l'IL-2 (Bierer *et al.*, 1990b ; Dumont *et al.*, 1990). Malgré l'efficacité de ces molécules, la CsA reste à ce jour le traitement de choix. La recherche de molécules capables de fixer la CyPA 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 efficace. 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, mais son mode d'action est différent de ceux connus pour les autres médicaments. En effet, il s'agirait de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Zhang & Liu, 2001 ; Zhang *et al.*, 2001 ; Allen *et al.*, 2004). De plus, récemment, Steinschulte *et al.* (2006) ont montré que la SFA inhibe rapidement l'expression de l'IL-12, une cytokine inflammatoire impliquée dans la prolifération des cellules Th1 et NK, reliant les immunités innée et adaptative. Ce composé inhibe également la prolifération induite par le M-CSF (*macrophage colony-stimulatory factor*) sur les macrophages, soulevant l'implication des cyclophilines dans les phénomènes de prolifération (Sanchez-Tilló *et al.*, 2006).

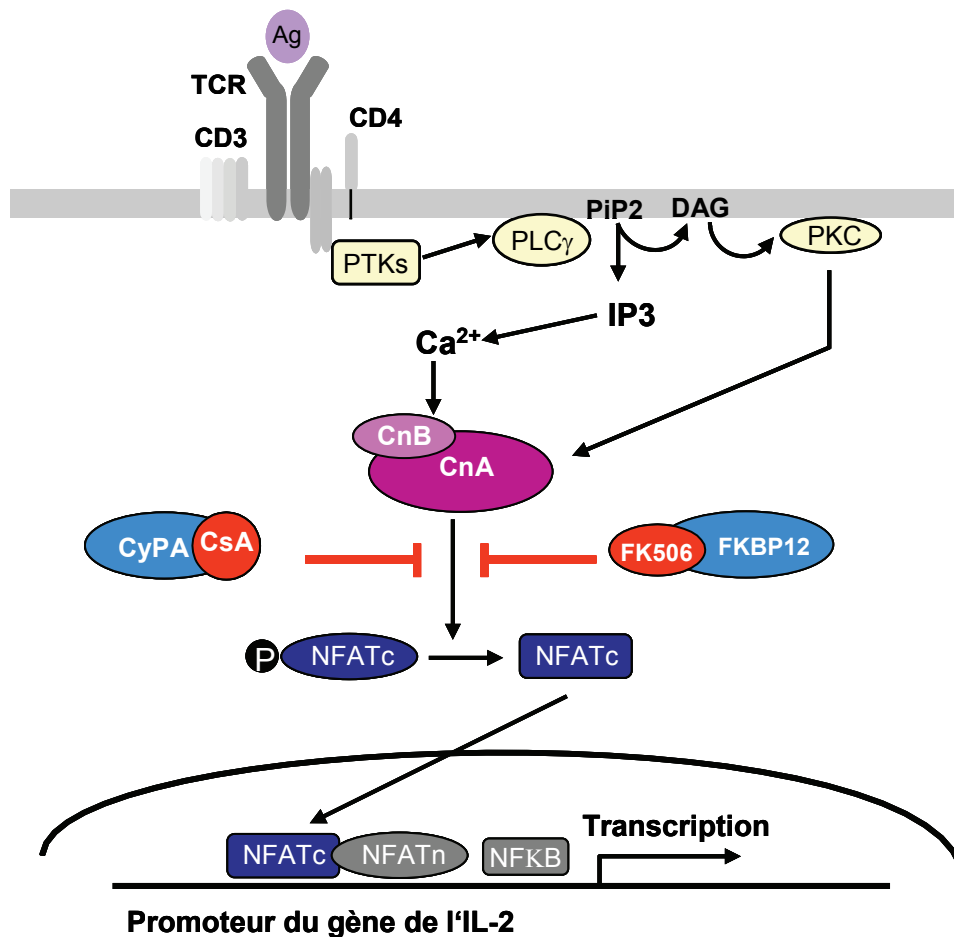
## **C. 2. Mécanismes moléculaires de l'immunosuppression**

La formation des complexes Cyclophiline/CsA et FKBP/FK506 inhibe l'activité PPIase (Fisher *et al.*, 1989 ; Harding *et al.*, 1989 ; Siekierka *et al.*, 1989 ; Galat *et al.*, 1993 ; Peattie *et al.*, 1992), indiquant que le site de fixation des immunosuppresseurs et le site catalytique sont confondus. Cette constatation a suggéré que l'activité immunosuppressive dépend de l'inhibition de l'activité PPIase des immunophilines. Toutefois, les faibles doses effectrices de médicaments ne sont pas suffisantes pour inhiber les taux importants d'immunophilines dans les cellules (Schreiber, 1991 ; Sigal & Dumont, 1992). Par ailleurs, la découverte d'analogues de CsA et de FK506 non immunosuppresseurs mais inhibant toujours l'activité PPIase, suggère 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).

La CsA et le FK506 bloquent l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes de cytokines, telles que l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  (*interferon- $\gamma$* ), le TNF- $\alpha$  (Granelli-Piperno, 1988 ; Tocci *et al.*, 1989 ; Bierer *et al.*, 1990b), la dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques, mastocytes et granulocytes (Trenn *et al.*, 1989 ; Cirillo *et al.*, 1990 ; Dutz *et al.*, 1993), l'apoptose de cellules T induite *in vitro* et la sélection des thymocytes *in vivo* (Shi *et al.*, 1989 ; Bierer *et al.*, 1991 ; Fruman *et al.*, 1992). Ces phénomènes d'activation sont liés à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire et à l'activation d'une sérine/thréonine phosphatase Ca<sup>2+</sup>- 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). La calcineurine est une enzyme clé dans l'activation de la transcription de l'IL-2, ce qui a pour conséquence de favoriser la prolifération lymphocytaire. *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 ; Kieffer *et al.*, 1992 ; Swanson *et al.*, 1992). La formation de complexes ternaires avec la calcineurine induit des défauts de déphosphorylation des substrats potentiels de la calcineurine (Fruman *et al.*, 1992b ; Liu *et al.*, 1992). Dans les lymphocytes T, l'un des substrats de la calcineurine est la sous-unité cytosolique du facteur de transcription NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*). 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 (Figure 6) (Jain *et al.*, 1992 ; 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 MAPK est également impliquée dans l'induction de l'expression de l'IL-2. Les complexes immunophiline/ligand bloquent l'activation des voies p38 MAPK 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).

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 PI3-kinases, dénommée FRAP (*FKBP12 and rapamycin-associated protein*), RAFT1 (*rapamycin and FKBP12 target*) ou mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Cette kinase a pour cible des molécules impliquées dans la régulation du cycle cellulaire comme les kinases Cdk1 et Cdk2. De plus, il est apparu que mTOR joue un rôle majeur dans l'assemblage du ribosome et la régulation de la traduction des protéines en régulant l'activité de p70 S6 kinase. Ces données expliquent le puissant effet anti-prolifératif de la rapamycine.



**Figure 6:** Mécanisme d'immunosuppression des cyclophilines et des FKBP12

L'implication thérapeutique d'analogues de cette molécule est d'ailleurs étudié dans le développement de thérapies anti-cancéreuses (Abraham, 1998 ; Bjelogrljic *et al.*, 2006). *In vivo*, la CyPB est une autre immunophiline impliquée dans l'activité immunosuppressive (Bram *et al.*, 1993). Si la localisation intracytoplasmique de la CyPA et de la FKBP est en adéquation avec l'activité immunosuppressive, l'implication de la CyPB est plus surprenante du fait de sa compartimentation. Alors que la CsA diffuse passivement dans toutes les cellules du sang lorsqu'elle est sous forme libre, son incorporation dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est favorisée en présence de CyPB (Denys *et al.*, 1998a). La CyPB complexée à la CsA se fixe sur les lymphocytes T, ce qui augmente la concentration de CsA à la proximité des membranes. En effet, en présence de CyPB, l'IC50 de la CsA chute de 175 ± 40 ng/ml à 40 ± 12 ng/ml (Allain *et al.*, 1996). De plus, la sensibilité inter-individuelle à la CsA disparaît en présence de CyPB car tous les individus acquièrent un phénotype répondeur sensible au médicament (Denys *et al.*, 1998b). La CyPB contribue donc à l'efficacité du traitement immunosuppresseur. De tels effets bénéfiques n'ont pas été observés pour le FK506. Au contraire, la présence de FKBP12 extracellulaire diminue l'efficacité anti-proliférative du FK506 *in vitro*. En piégeant le médicament, la FKBP plasmatique diminue la concentration active du médicament dans le sang (Shirakata *et al.*, 1995).

### **C. 3. Autres activités de la cyclosporine A**

La CsA a fait l'objet de nombreux travaux démontrant son efficacité dans d'autres pathologies comme l'inflammation. Al-Daraji *et al.* (2002) ont montré la présence de calcineurine active dans des cellules non T telles que les kératinocytes humains. En cas de psoriasis, les taux de NF-AT nucléaires sont fortement augmentés. Dès lors, la CsA peut être un bon agent thérapeutique contre les maladies de peau de ce type. De plus, la CsA, en se combinant aux cyclophilines extracellulaires, peut empêcher ces protéines de se fixer sur leurs cellules cibles. En effet, les CyPA et CyPB possèdent une activité chimioattractante envers les éosinophiles, les neutrophiles et les monocytes (Xu *et al.*, 1992 ; Sherry *et al.*, 1992 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; Allain *et al.*, 2002). La CyPB possède également une activité pro-adhésive pour les lymphocytes T (Allain *et al.*, 2002). Ces activités sont inhibées en présence de CsA. Ainsi, l'utilisation d'un analogue non immunosuppresseur de la CsA inhibe la réponse inflammatoire induite par les cyclophilines extracellulaires dans des modèles d'inflammation aiguë du poumon ou d'asthme allergique (Arora *et al.*, 2005 ; Gwinn *et al.* 2006).

La CsA et ses dérivés immunosuppresseurs sont également capables d'inhiber la réplication du HIV-1 (*human immunodeficiency virus type 1*) (Rosenwirth *et al.*, 1994 ; Thali *et al.*, 1994 ; Mlynar *et al.*, 1997). En inhibant l'incorporation de la CyPA dans les virions, la CsA réduit le pouvoir infectieux du HIV-1 (Minder *et al.*, 2002). Récemment, des analogues non-immunosuppresseurs de CsA comme le NIM811 (Novartis) ou le Débio-025 (Débiopharm) ont été utilisés comme inhibiteur de la réplication du virus HCV (*hepatitis C virus*). De plus, un effet synergique est constaté lors de l'utilisation simultanée de ces composés avec l'IFN- $\alpha$ , médicament de référence contre l'hépatite C. Ces données apportent un nouvel élan dans la recherche de traitements contre ces maladies virales (Galeazzi *et al.*, 2006 ; Paeshuyse *et al.*, 2006).

Les immunophilines sont fortement exprimées dans le cerveau notamment au niveau des neurones où elles colocalisent avec la calcineurine. Cette phosphatase, 3 à 10 fois plus abondante dans les cellules neuronales, est une enzyme importante de la transduction du signal neuronal. En effet, elle intervient dans l'activité des canaux calciques, la libération de glutamate et dans la plasticité neuronale. L'inhibition de la calcineurine par les immunosuppresseurs induit des effets neuroprotecteurs contre la toxicité au glutamate, l'apoptose ou encore l'ischémie cérébrale. *In vitro*, les immunosuppresseurs ont des effets neurotrophiques au niveau de la croissance neuritique et la régénération neuronale. La CsA protège également les neurones contre l'apoptose dans de nombreux modèles cellulaires et animaux (Gold, 2000). Toutefois, les dérivés non-immunosuppresseurs conservent leurs activités neuronales, suggérant que le mode d'action de ces molécules est indépendant de la calcineurine. Cet effet serait soit dépendant de l'inhibition des immunophilines, notamment de la CyPD constituant du pore mitochondrial, soit de l'augmentation de l'expression des immunophilines dépendante des immunosuppresseurs (Sullivan *et al.*, 1999 ; Hansson *et al.*, 2004). Les effets de la CsA et de ses dérivés au niveau cérébral étaient intéressants et prometteurs. Comme tout composé hydrophobe, la CsA diffuse difficilement au travers de la barrière hémato-encéphalique. Les doses efficaces prescrites seraient si importantes qu'elles conduiraient à des phénomènes de toxicité. Ces raisons ont conduit à l'abandon du développement de ces molécules.

L'apparition de résistances aux médicaments anti-cancéreux (MDR) est la principale cause d'échec des traitements. Cette perte de sensibilité des cellules cancéreuses peut se résorber par l'utilisation d'analogues non-immunosuppresseurs. En interagissant au niveau des mécanismes d'échappement mis en place par les cellules, notamment avec la P-glycoprotéine du transporteur ABC, ces composés empêchent le rejet du médicament anti-cancéreux des cellules (Aouali *et al.*, 2005).

## D/ Activités biologiques des cyclophilines

### D.1. Les cyclophilines intracellulaires

L'activité PPIase a suggéré l'implication des cyclophilines dans la mise en conformation des protéines néosynthétisées. Les cyclophilines pourraient également jouer un rôle dans la renaturation des protéines dénaturées par choc thermique, irradiation aux UV, changements de pH et ainsi être considérées comme des protéines chaperones *in vivo*. La participation des cyclophilines dans cette activité reste toutefois ambiguë (Barik, 2006).

#### D. 1.1. Régulation du transport de protéines néosynthétisées

De nombreux travaux ont suggéré que le transport de protéines synthétisées est sous le contrôle de cyclophilines. Chez la drosophile, la participation de *nina A* dans le transport des rhodopsines Rh1 et Rh2 des photorécepteurs R1-R6 a été caractérisée dès 1991 (Colley *et al.*, 1991 ; Baker *et al.*, 1994). La CyPB participe à la maturation du collagène puisque l'inhibition de son activité PPIase retarde la sécrétion du procollagène I (Steinmann *et al.*, 1991 ; Smith *et al.*, 1995). La CyPB est également complexée à la prolactine et faciliterait le rétrotransport de cette protéine vers le noyau (Rycyzyn *et al.*, 2000). L'activité PPIase de la CyPA est nécessaire à l'expression de la forme fonctionnelle des récepteurs nicotiques et sérotoninergiques transfectées dans les oocytes de xénope (Helekar & Patrick, 1997). Cet effet semble être lié à l'inhibition d'une activité chaperone des cyclophilines. Plus récemment, Huang *et al.* (2002) ont montré que la CyPA fait partie d'un complexe transporteur qui régule l'expression du récepteur des asialoprotéines à la surface des cellules humaines. L'utilisation de CsA inhibe l'expression du CD147 à la surface de différents types cellulaires, suggérant l'implication d'une cyclophiline dans le transport du récepteur à la membrane (Yurchenko *et al.*, 2005b). La même année, Pushkarsky *et al.* (2005) ont montré que la cyclophiline 60 escorte le CD147 depuis l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique. Ce phénomène est dépendant de l'interaction entre l'enzyme et la proline 211 du CD147. De la même façon, l'expression membranaire du récepteur à l'insuline et du Flt3 ligand semblent également sous le contrôle d'une cyclophiline (Shiraishi *et al.*, 2000 ; Chklovskaja *et al.*, 2001).

#### D. 1.2. Régulation des protéines de signalisation

Récemment, il a été démontré que la CyPA est capable de catalyser l'interconversion *cis/trans* d'une liaison peptidyl-prolyle située dans le domaine SH2 de la protéine Itk (*IL-2 tyrosine kinase*). Cette kinase joue un rôle dans la maturation des thymocytes et participe à la

signalisation du TCR (*T-cell receptor*). La conformation de la liaison imide détermine l'état d'activation de I $\kappa$ k. En interagissant avec la Pro 287, la CyPA favorise la forme *cis*. Cette conformation induit l'homodimérisation de I $\kappa$ k et par conséquent son inhibition. La présence de CsA inhibe l'activité de la CyPA, démontrant l'importance de l'activité PPIase. Il est à noter que les FKBP ne se fixent pas à I $\kappa$ k, suggérant que l'effet sur cette protéine n'est pas lié à l'immunosuppression. L'ensemble de ces données prouve l'existence d'une protéine intracellulaire régulée par l'activité PPIase des cyclophilines (Brazin *et al.*, 2002). Des travaux sur des souris déficientes en CyPA montrent que ces animaux présentent des allergies caractéristiques d'une surexpression de cytokines de type Th2, et notamment d'IL-4, causées par une suractivation de I $\kappa$ k chez ces souris (Colgan *et al.*, 2004). En 2004, des expériences de double hybride chez la levure ont identifié une interaction fonctionnelle entre la partie cytoplasmique du CD99 et la CyPA. Le CD99 est une protéine transmembranaire impliquée dans la migration de monocytes, la différenciation et l'apoptose des cellules T et des thymocytes. L'activation du CD99 induit le recrutement de la CyPA suggérant que cette dernière est une protéine de signalisation du CD99 (Kim *et al.*, 2004b). Enfin, une activité proliférative a été décrite pour la CyPA. En effet, elle participerait à la signalisation induite par le M-CSF sur les macrophages puisque l'utilisation de sangliféhrine A, inhibe l'effet du M-CSF (Sanchez-Tilló *et al.*, 2006).

De la même façon, des travaux sur la CyPB ont montré son implication dans la régulation de protéines de signalisation. La *calcium-signal modulating cyclophilin ligand* (CAML) est une glycoprotéine transmembranaire de 44 kDa. Elle contient 3 régions C-terminales hydrophobes transmembranaires, un court domaine intraluminal et un large domaine cytosolique (Bram & Crabtree, 1994). La CAML est colocalisée avec le Ca<sup>2+</sup>, l'ATPase II Ca<sup>2+</sup>-dépendante, la calréticuline et la CyPB dans le réticulum endoplasmique ou le réticulum sarcoplasmique (Holloway & Bram, 1996 ; Holloway & Bram, 1998). Ce complexe CyPB/CAML est impliqué dans la régulation de l'ouverture de canaux calciques (Holloway & Bram, 1996). En régulant la libération de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, la CAML régulerait l'activation de la calcineurine et ainsi l'activation transcriptionnelle du gène de l'IL-2 (Bram & Crabtree, 1994). Ces données suggèrent un autre rôle de la CyPB dans l'immunosuppression. De plus, une association entre la CyPB et l'IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) endogène a été caractérisée lors de l'infection de cellules de fibrosarcome HT1080 par le virus NDV (*newcastle disease virus*). L'IRF-3 est un facteur de transcription impliqué dans l'expression de l'IFN- $\beta$ . L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre la CyPB induit un défaut de phosphorylation de l'IRF-3, ce qui bloque l'expression de l'IFN- $\beta$ . Le domaine PPIase serait nécessaire à l'interaction avec l'IRF-3

(Obata *et al.*, 2005). Enfin, une interaction entre la CyPB et la synapsine 2, une phosphoprotéine neuro-spécifique impliquée dans la régulation des vésicules présynaptiques et la libération de neurotransmetteur, a été caractérisée. Cette interaction place les immunophilines intracellulaires comme des régulateurs de la libération de neurotransmetteurs (Lane-Guermonprez *et al.*, 2005).

#### D. 1.3. Régulation de l'apoptose

L'ouverture du pore mitochondrial provoque un gonflement de la mitochondrie, phénomène appelé MPT (*mitochondrial permeability transition pore*) impliqué dans l'induction de l'apoptose cellulaire (Kroemer *et al.*, 1997 ; Crompton *et al.*, 1999). Des conditions de stress oxydatif ou l'exposition à des concentrations calciques élevées provoque son ouverture. Il est constitué d'un complexe multimoléculaire comprenant un canal ionique voltage-dépendant situé dans la membrane externe, de l'ANT (*adenine nucleotide translocase*) située dans la membrane interne et de la CyPD située dans la matrice (Tanveer *et al.*, 1996). Lors d'un stress cellulaire, la CyPD se fixe à l'ANT, ce qui maintient le pore mitochondrial en conformation ouverte (Lin & Lechleiter, 2002). Ainsi, des cellules murines déficientes en CyPD sont résistantes à l'apoptose induite par le calcium ou les espèces oxygénées réactives (ROS) (Baines *et al.*, 2005). Toutefois, Nakagawa *et al.* (2005) suggèrent que le MPT régule certaines formes de nécroses plutôt que l'apoptose.

Il a été démontré que lors de l'induction de l'apoptose, une protéine à activité NADH oxydase, l'*apoptosis-inducing factor* (AIF) subit une translocation vers le noyau où il induit la dégradation de l'ADN par un mécanisme caspase-dépendant (Ruchalski *et al.*, 2003). Or, en 2004, Candé *et al.* ont montré que l'activité de l'AIF est dépendante de son interaction avec la CyPA. En effet, des mutants de l'AIF dépourvus de domaine de liaison à la CyPA sont incapables d'induire la dégradation de l'ADN. Ces données démontrent l'intervention des cyclophilines dans la régulation des phénomènes d'apoptose.

Parallèlement, une activité nucléasique intrinsèque a été décrite par certains auteurs. *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). 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. Cette activité nucléasique est remise en question par les travaux de Manteca & Sanchez (2004) qui imputent cette activité des cyclophilines recombinantes à une contamination par l'endonucléase d'*E. coli*.



#### D. 1.4. Interaction avec le HIV-1

L'implication des cyclophilines dans le cycle infectieux du virus HIV-1 fut une découverte inattendue. *In vitro*, les CyPA, CyPB et CyPC forment des complexes stables avec la p55<sup>Gag</sup> et la gp120 du virus (Luban *et al.*, 1993 ; Franke *et al.*, 1994 ; Endrich et Gehring, 1998). Or, seule la CyPA est retrouvée incorporée dans les virions durant l'assemblage du virus (Franke *et al.*, 1994 ; Thali *et al.*, 1994). Cette interaction semble indispensable aux étapes précoces du cycle infectieux, étapes qui interviennent après la fixation du virus et la fusion membranaire, mais avant l'action de la transcriptase réverse (Braaten *et al.*, 1996b). Par ailleurs, la CyPA ne jouerait 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). 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).

L'interaction entre la CyPA et la protéine virale fait intervenir d'une part le site de fixation à la CsA et le site enzymatique de la CyPA (Braaten *et al.*, 1997 ; Dorfman *et al.*, 1997) et d'autre part le domaine antigène capsidique (CA) de la protéine p55<sup>Gag</sup> (Colgan *et al.*, 1996). Des études plus approfondies ont mis en évidence que la boucle située entre la quatrième et la cinquième hélice  $\alpha$  du domaine CA, très riche en proline était à l'origine de la fixation de la CyPA. Plus précisément, il s'agit de la proline 90 (Gamble *et al.*, 1996 ; Vajdos *et al.*, 1997). Ces données suggèrent l'implication du domaine PPIase dans cette activité. L'utilisation de CsA bloque l'incorporation de la CyPA et induit la diminution du pouvoir infectieux des virions (Rosenwirth *et al.*, 1994 ; Thali *et al.*, 1994 ; Bartz *et al.*, 1995 ; Mlynar *et al.*, 1997). Toutefois, Saphire *et al.* (2002) ont démontré que l'effet de la CyPA sur la réplication virale est indépendant de l'activité PPIase. Ce site servirait simplement à la fixation de la CyPA. Lors de la maturation du virus, la protéine Gag est clivée. La protéine CA libérée change de conformation, notamment au niveau de son extrémité C-terminale. De nouveaux sites de fixation pour la CyPA sont alors exposés (Endrich *et al.*, 1999 ; Dietrich *et al.*, 2001). Ces nouvelles interactions participeraient à la formation de la capsidique qui protège l'ARN viral et dont le désassemblage est essentiel lors de l'infection. La CyPA participerait soit en tant que chaperone des protéines de la capsidique soit en tant que conformase de façon à éviter la formation d'une capsidique déficiente dans le désassemblage. De plus, selon Minder *et al.* (2002), la CsA ne diminue pas la production d'ADN proviral dans un premier temps, mais son effet inhibiteur est constaté tardivement puisque les virions alors formés sont moins longtemps infectieux. Ces données suggèrent que la CsA gêne des interactions tardives notamment celles entre la CyPA et la capsidique.

L'interaction avec la CyPA semble spécifique aux protéines du HIV-1 et du SIVcpz, un autre lentivirus très proche du HIV-1. Les protéines Gag d'autres rétrovirus tels que le HIV-2, le SIVmac ou encore le FIV n'interagissent pas avec la CyPA (Braaten *et al.*, 1996). Toutefois, Lin *et al.* (2006) ont montré que les virus FIV et SIVagm interagissent avec la CyPA par l'intermédiaire de la même proline que dans le cas du HIV-1. Cette interaction est nécessaire à l'infection par les virus FIV et SIVagm comme cela a été décrit pour le HIV-1. Selon ces auteurs, la présence de la proline 90 est essentielle mais pas suffisante. L'interaction serait également dépendante de la longueur de la boucle portant ce résidu de proline.

Suite à son incorporation, la CyPA subit une translocation à la surface du virus et pourrait alors interagir avec des récepteurs présents à la surface des cellules cibles (Sherry *et al.*, 1998). Les protéoglycanes à chaînes héparanes sulfates (HSPG) et plus particulièrement les syndécans ont été identifiés comme des co-récepteurs du virus HIV-1. Une interaction entre les HSPG des cellules cibles et des acides aminés basiques situés dans la région C-terminale de la CyPA a été proposée (Saphire *et al.*, 1999 ; Saphire *et al.*, 2001). Toutefois, Zhang *et al.* (2002) excluent un rôle majeur des protéoglycanes 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.

Récemment, la CyPB a été impliquée dans la réplication d'un autre virus, le HCV. Elle se lie à la RNA polymérase NS5B, ce qui facilite la fixation de cette dernière à l'ARN. Cette liaison à l'ARN est cruciale pour la réplication virale (Watashi *et al.*, 2003 ; 2005). La CyPB est donc un récepteur intracellulaire pour le virus et devient une cible pour le développement de nouvelles thérapies basées sur l'utilisation d'analogues non immunosuppresseurs (Ma *et al.*, 2006 ; Paeshuyse *et al.*, 2006).

## **D. 2. Les cyclophilines extracellulaires**

### D. 2.1. Expression des cyclophilines sécrétées lors de l'inflammation

Le peptide signal présent dans la séquence codante de la CyPB lui permet d'être dirigée vers la voie de sécrétion. Elle est retrouvée dans les milieux biologiques tels que le plasma et le lait (Spik *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995). Par ailleurs, elle est constitutivement sécrétée par les fibroblastes et l'expression de son ARNm est fortement augmentée dans des fibroblastes rénaux interstitiels activés par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IP10

(*interferon inducible protein-10*) et MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) (Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996). Elle est également un produit de sécrétion de cellules vasculaires de muscles lisses en réponse à un stress oxydatif (Liao *et al.*, 2000). Elle est constitutivement sécrétée par les chondrocytes, mais sa sécrétion est fortement augmentée en présence de CsA (De Ceuninck *et al.*, 2003). Dès lors, la protéine se fixe sur les protéoglycanes de la matrice extracellulaire où il se crée un réservoir de CyPB. Elle est ensuite présentée aux leucocytes en cours de recrutement comme c'est le cas pour les facteurs de croissance, les cytokines et les chimiokines. Ces auteurs ont également montré que des métalloprotéinases (MMP-1, 2, 3, 9 et 13) libèrent la CyPB intacte par dégradation des protéoglycanes. Par conséquent, la CyPB libérée est immédiatement disponible.

La CyPA est retrouvée dans le sérum de patients atteints de septicémie (Tegeeder *et al.*, 1997) ou infectés par le HIV (Endrich & Gehring, 1998), mais aussi dans les zones riches en macrophages au sein des liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Billich *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2005). De plus, elle est fortement sécrétée par les macrophages et les cellules endothéliales en réponse aux LPS (Sherry *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 2004a). Par ailleurs, elle est sécrétée par des cellules vasculaires de muscles lisses dans un modèle *in vivo* de dommage vasculaire (Jin *et al.*, 2000). Plus récemment, la même équipe a montré que la CyPA est fortement exprimée dans les plaques d'athérosclérose impliquant la protéine dans les maladies cardiovasculaires. (Jin *et al.*, 2004). Des myocytes cardiaques de rat en culture soumis à l'hypoxie/réoxygénation sécrètent la CyPA. Ces résultats ont d'ailleurs été vérifiés *in vivo* lors d'ischémie/reperfusion (Séko *et al.*, 2004).

A la différence de la CyPB, la CyPA n'est pas retrouvée dans les milieux extracellulaires en absence de stimuli inflammatoires. Suzuki *et al.* (2006) ont montré que la sécrétion de CyPA par des cellules vasculaires de muscle lisse est régulée par un transport vésiculaire hautement régulé. L'activation de la myosine II et le remodelage de l'actine nécessaires à ce transport sont dépendants de l'activation respective de la Rho-GTPase RhoA et de Cdc42. Toutefois, le mécanisme à l'origine de cette sécrétion reste inconnu. Des études complémentaires apporteront des éléments de compréhension sur la pathogénicité de la CyPA.

#### D. 2.2. Activité chimioattractante

La recherche de nouveaux facteurs chimioattractants pour les éosinophiles a conduit Xu *et al.* (1992) à constater que la CyPA stimule la migration et la dégranulation des éosinophiles et des neutrophiles. Parallèlement à ces travaux, la CyPA normalement

intracellulaire a été identifiée comme un produit de sécrétion de macrophages de souris stimulés par le LPS. Elle est dès lors capable d'induire le recrutement de leucocytes polymorphonucléaires et de monocytes (Sherry *et al.*, 1992). Récemment, Kim *et al.* (2004a) ont démontré que la CyPA induit la migration de cellules endothéliales de façon dose-dépendante à travers une couche de gélatine. Ces auteurs supposent l'activation de métalloprotéinases par la CyPA à l'origine de cette migration. De même, la CyPB induit la migration des neutrophiles et des lymphocytes T (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Allain *et al.*, 2002). Un autre phénomène pro-inflammatoire complémentaire au chimiotactisme a été décrit par Allain *et al.* (2002). La CyPB induit l'adhérence des cellules T sur la fibronectine, un constituant de la matrice extracellulaire. Cette adhérence relève de l'activation des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$ . Il est à noter que seule la CyPB stimule l'adhérence et que les lymphocytes T mémoires ( $CD45RO^+$ ) semblent répondre plus efficacement à la CyPB que les autres sous-populations lymphocytaires, suggérant que la protéine recrute spécifiquement certaines cellules sur le site de l'inflammation.

Cette activité chimioattractante des cyclophilines est bloquée en présence de CsA, soulevant une fois de plus l'importance de l'activité PPIase (Xu *et al.*, 1992 ; Sherry *et al.*, 1992 ; Allain *et al.*, 2002). Par ailleurs, Yurchenko *et al.* (2001 ; 2002) ont montré que l'activité chimiotactile des CyPA et CyPB est dépendante de la présence du CD147 à la membrane plasmique. Membre de la superfamille des immunoglobulines, le CD147 est une glycoprotéine de 40 à 70 kDa exprimée à la surface de nombreux types cellulaires (Gething & Sambrook, 1992 ; Bartz *et al.*, 1995 ; Billich *et al.*, 1995) et est considéré par Yurchenko *et al.* (2001 ; 2002) comme le récepteur membranaire des cyclophilines sécrétées.

De telles activités n'étaient jusqu'alors réservées qu'aux chimiokines. Toutefois, les données récentes placent les cyclophilines sécrétées en tant que de nouveaux médiateurs de l'inflammation (Bukrinsky, 2002).

## II. Propriétés des cyclophilines sécrétées

La découverte d'activités biologiques induites par les cyclophilines extracellulaires a suggéré l'existence de sites de fixation à la surface des cellules. Un complexe multimoléculaire récepteur a ainsi été caractérisé. La fixation des cyclophilines à la surface de différents types cellulaires a permis l'identification de voies de signalisation associées au récepteur et l'implication de ces protéines dans certains processus pathologiques.

## **A/ Caractérisation des sites de fixation**

En raison de l'implication des CyPA et CyPB dans l'activité immunosuppressive de la CsA et de la présence de CyPB dans le plasma, les premières études de fixation de la CyPB ont été réalisées au Laboratoire sur les lymphocytes T. Dans ce contexte, Allain *et al.* (1994) ont mis en évidence des sites spécifiques de fixation de la CyPB sur les cellules de la lignée lymphoblastique Jurkat ainsi que sur les lymphocytes T purifiés du sang.

Grâce à des expériences de double marquage en cytofluorimétrie en flux, Denys *et al.* (1997) ont étudié la répartition des sites de fixation de la CyPB à la surface des différentes sous-populations lymphocytaires du sang. Ces sites sont distribués de la même façon sur les lymphocytes naïfs et mémoires, mais seuls les lymphocytes T sont impliqués dans cette interaction et plus particulièrement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les cellules activées *in vitro* présentent un taux plus faible de récepteurs que les cellules non activées alors que l'affinité reste constante, ce qui suggère que l'activation des cellules induit une régulation négative de l'expression de ces récepteurs. Ces données montrent que l'expression des récepteurs est dépendante du type de lymphocytes et de l'état d'activation de ces cellules.

De même, Sherry *et al.* (1998) ont montré que la CyPA possédait des sites de fixation spécifiques à la surface des lymphocytes T. Elle interagit avec un complexe de haute masse moléculaire qui pourrait être impliqué dans le processus d'infection du HIV-1. Par ailleurs, la découverte de réponses cellulaires induites par les CyPA et CyPB suggère l'existence de récepteurs fonctionnels communs aux deux protéines (Sherry *et al.*, 1998 ; Allain *et al.*, 1999 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; Allain *et al.*, 2002).

Par la suite, il a été démontré que les cyclophilines sont capables de se fixer sur de nombreuses cellules comme les neutrophiles, les plaquettes et même les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et les astrocytes, démontrant la présence de récepteurs à la surface de ces cellules (Allain *et al.*, 1999 ; Carpentier *et al.*, 1999a ; Yurchenko *et al.*, 2001).

Les travaux menés au Laboratoire ont ensuite montré que coexistaient deux types de sites de fixation 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 par un pH acide, suggérant que ce récepteur est de nature protéique. Un traitement à l'héparinase I diminue de moitié la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T. En effet, elle se fixe à l'héparine avec une forte affinité et cette liaison n'est rompue que par l'ajout d'une solution de NaCl à 0,6 M. Ces données ont permis de conclure que le second site correspond à des chaînes héparanes sulfates portées par les protéoglycanes membranaires (HSPG) (Denys *et al.*, 1998a).

Parallèlement à ces travaux, d'autres équipes ont essayé de caractériser les récepteurs potentiels des cyclophilines. Ainsi, par la méthode de double hybride chez la Levure, Bram & Crabtree (1994) ont identifié la CAML comme étant un récepteur intracellulaire de la CyPB. Toutefois, aucune expression de cette protéine à la surface des cellules n'a pu être caractérisée. En recherchant des récepteurs du virus HIV, Pushkarsky *et al.* (2001) ont mis en évidence une interaction entre le CD147 et la CyPA incorporée dans les virions. Les travaux suivants ont démontré que le CD147 pouvait être considéré comme récepteur des CyPA et CyPB (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002). En effet, les cellules CHO ne sont capables de répondre aux deux cyclophilines que si elles sont préalablement transfectées avec le CD147.

## **B/ Le CD147, récepteur de signalisation des cyclophilines**

### **B. 1. Structure et expression**

Le CD147 appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Il est exprimé à des taux variables à la surface de nombreux types cellulaires comme les cellules hématopoïétiques, endothéliales, épithéliales et leucocytaires et ce aussi bien chez l'adulte que chez l'embryon (Stockinger *et al.*, 1997). Il est constitué d'une partie N-terminale extracellulaire comportant deux domaines Ig, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique (Toole, 2003 ; Gabison *et al.*, 2005 ; Yurchenko *et al.*, 2006). Une forme avec trois domaines Ig a toutefois été caractérisée (Hanna *et al.*, 2003). Son expression membranaire est dépendante de l'interaction entre la Pro<sup>211</sup> de son domaine transmembranaire et la CyP60 (Pushkarsky *et al.*, 2005 ; Yurchenko *et al.*, 2005). L'ARNm du CD147 code pour une protéine de 28 kDa qui est ensuite N-glycosylée, lui donnant une masse comprise entre 44 et 66 kDa. Le domaine Ig proximal de la membrane plasmique porte deux sites de glycosylation alors que celui distal ne présente qu'un seul résidu d'asparagine. Toutefois, cette glycosylation varie en fonction du type cellulaire. Le domaine transmembranaire est très conservé entre les espèces, démontrant son importance dans l'activité de la molécule. Il contient un résidu chargé (Glu<sup>218</sup>) qui aurait pour effet de déstabiliser la forme monomérique du CD147. En revanche, ce résidu pourrait expliquer la capacité du CD147 à former des complexes membranaires avec d'autres protéines de façon à être convenablement ancré dans la bicouche lipidique. Il a été aussi démontré que le CD147 se retrouve sous forme d'oligomères à la surface cellulaire (Yurchenko *et al.*, 2006).

Découvert chez l'homme comme un facteur inducteur de métalloprotéinases dans des co-cultures de cellules cancéreuses et de fibroblastes (Biswas *et al.*, 1982 ; 1984), il fut

longtemps dénommé EMMPRIN pour Extracellular Matrix MetalloPRoteinase Inducer. Des activités variées lui ont été attribuées depuis. Par souci d'harmonisation, il est désormais appelé CD147.

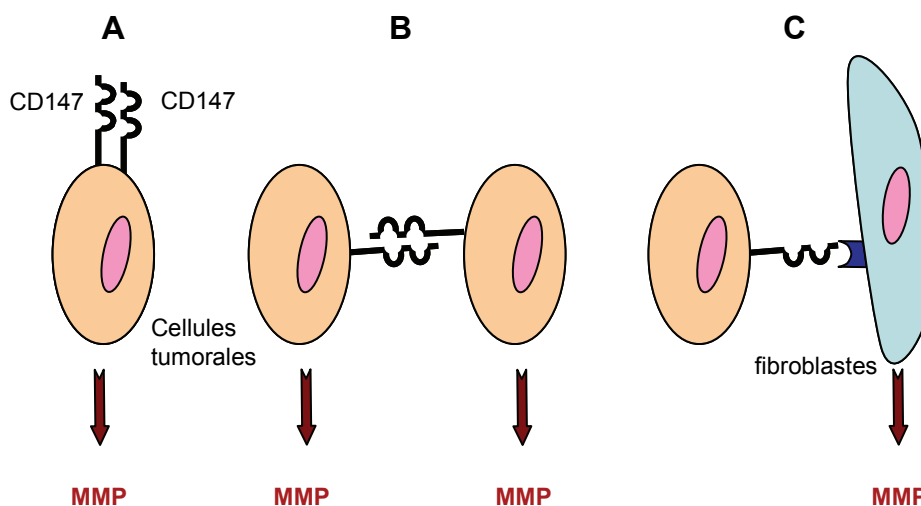
## **B. 2. Le CD147, un inducteur de métalloprotéinases**

Les métalloprotéinases sont des enzymes importantes pour le maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire. Par conséquent, elles jouent un rôle prédominant dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, comme l'homéostasie tissulaire, le remodelage articulaire mais aussi dans les cancers et les maladies inflammatoires chroniques.

Le CD147 augmente l'expression de MMP-1 (collagénase), MMP-2 (gélatinase), MMP-3 (stromyelin-1) par des fibroblastes ou des cellules endothéliales cultivés en présence de cellules tumorales (Biswas *et al.*, 1982 ; 1984 ; Kataoka *et al.*, 1993 ; Caudroy *et al.*, 2002). Il agit également sur les formes membranaires de MMPs en induisant l'expression de MT1-MMP et MT2-MMP. Toutefois, l'expression de la MT3-MMP reste inchangée. (Kanekura *et al.*, 2002 ; Sameshima *et al.*, 2003). Des corrélations entre l'expression du CD147 et celle de la MMP-9 ont été relatées sans qu'aucune action directe du CD147 ne soit prouvée (Toole *et al.*, 2003). Ces résultats démontrent que des interactions hétérotypiques entre les cellules tumorales et les fibroblastes sont nécessaires à la synthèse de MMPs par le CD147. L'hypothèse de la présence d'un récepteur du CD147 sur les fibroblastes a été émise pour expliquer cet effet (Figure 7). Il semble que le domaine Ig distal soit essentiel à l'expression de MMPs. Néanmoins, l'état de glycosylation du CD147 est important. Les formes non ou peu glycosylées sont peu efficaces dans la production de ces enzymes. Les trois sites de glycosylation doivent être occupés pour que l'activité du CD147 soit maximale (Biswas *et al.*, 1995 ; Guo *et al.*, 1997 ; Sun & Hemler, 2001). Le mécanisme à l'origine de cette expression est peu connu, mais il implique l'activation de la voie p38 MAPK (Lim *et al.*, 1998) ou l'activation de la phospholipase A et de la 5-lipoxygénase (Taylor *et al.*, 2002).

La surexpression du CD147 dans des fibroblastes ou des cellules tumorales conduit à la sécrétion de MMPs par ces cellules. Ces données suggèrent que des interactions homophiliques, soit entre molécules de CD147 à la surface d'une même cellule soit entre molécules situées sur des cellules adjacentes sont également responsables de cette activité (Figure 7) (Li *et al.*, 2001 ; Caudroy *et al.*, 2002 ; Zucker *et al.*, 2001). Ainsi, des oligomères de CD147 formés grâce au domaine Ig distal, seraient également responsables de l'induction de MMPs (Yoshida *et al.*, 2000).

De fortes concentrations de MMPs sont détectées dans les cancers. L'ARNm du CD147 est fortement exprimé dans les cellules tumorales en comparaison des cellules normales ou bénignes, notamment au niveau des tumeurs primaires et des métastases. Des expériences *in vitro* et des études cliniques ont montré que la surexpression de CD147 dans les tumeurs malignes est corrélée à l'expression des MMPs. Cette activité est inhibée par des anticorps bloquants dirigés contre le CD147.



**Figure 7:** Interactions du CD147 à l'origine de la sécrétion de MMPs

(A) Interaction homophile entre molécules de CD147 à la surface d'une même cellule tumorale ou (B) entre cellules tumorales. (C) Interaction hétérotypique entre le CD147 d'une cellule tumorale et un récepteur putatif du CD147 sur les fibroblastes (d'après Toole, 2003).

La localisation du CD147 à la périphérie des tumeurs confirme son implication dans le pouvoir invasif des tumeurs (Toole, 2003 ; Gabison *et al.*, 2004). Les travaux de Zucker *et al.* (2001) ont montré qu'une lignée cellulaire cancéreuse peu invasive transfectée par le CD147 induit des tumeurs à développement rapide chez la souris. Ces résultats démontrent que l'augmentation de l'expression du CD147 conduit à des tumeurs à haut pouvoir invasif et à croissance rapide. Ces données ont été confirmées grâce à l'utilisation de la méthode de l'ARN interférence. L'inhibition de l'expression du CD147 réduit la production de MMPs et la tumorigénèse associée. Les tumeurs perdent de leur agressivité car elles sont moins invasives et métastatiques (Chen *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2006 ; Zou *et al.*, 2007).

Le CD147 est également impliqué dans l'angiogénèse et la résistance aux médicaments des cellules tumorales. Certains travaux ont montré que l'absence de CD147 augmente la sensibilité des cellules à un médicament anti-cancéreux, le Paclitaxel (Zou *et al.*, 2007). Il est même devenu un marqueur de mauvais diagnostic dans les carcinomes ovariens.



Ainsi, l'implication du CD147 dans la progression tumorale est largement illustrée, notamment grâce à son effet sur la synthèse de MMPs. Le développement de thérapies visant le CD147 est d'ailleurs envisagé (Davidson *et al.*, 2003 ; Toole, 2003).

La surexpression du CD147 a également été caractérisée dans l'arthrite rhumatoïde, la cirrhose induite par l'hépatite C, les maladies vasculaires et cardiaques (Yurchenko *et al.*, 2006). Les travaux réalisés sur l'arthrite rhumatoïde ont montré que l'expression du CD147 est corrélée à celle de MMPs et à la sévérité de la destruction articulaire (Kontinnen *et al.*, 2000 ; Tomita *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2006). Ces données sont similaires à celles observées dans le cancer.

Alors que le domaine Ig le plus éloigné de la membrane plasmique est responsable de l'expression de MMPs, le second domaine est impliqué dans la fixation de la cavéoline-1. Cette association se fait avant le transfert du CD147 à la membrane et conduit à la diminution de l'oligomérisation de CD147. En effet, la cavéoline s'associe spécifiquement aux formes peu glycosylées, empêchant la glycosylation totale de la molécule. Ces données suggèrent que la cavéoline-1 est un régulateur négatif de la glycosylation donc de l'oligomérisation du CD147 et par conséquent de la production de MMPs (Tang & Hemler, 2004 ; Tang *et al.*, 2004).

### **B. 3. CD147 et adhérence cellulaire**

L'expression restreinte du CD147 sur les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de poulet avait suggéré son implication dans la formation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Risau *et al.*, 1986 ; Seulberger *et al.*, 1990 ; Schlosshauer & Herzog 1990). Son expression étant beaucoup plus large chez les mammifères, de nombreux travaux réalisés à l'aide de souris déficientes en CD147 ont montré que son absence n'affecte pas la formation de la BHE mais conduirait à certains dysfonctionnements neurologiques comme les troubles de la mémoire. En effet, le CD147 est fortement exprimé à la surface des neurones localisés dans les zones gérant les fonctions cognitives (Igakura *et al.*, 1996 ; Naruhashi *et al.*, 1997 ; Fan *et al.*, 1998).

Le CD147 est impliqué dans des phénomènes d'adhérence cellulaire. Il co-localise avec des molécules d'adhérence au niveau des zones de contact intercellulaire et interagit avec les intégrines  $\alpha3\beta1$  et  $\alpha6\beta1$  (Berditchevski *et al.*, 1997). Son homologie avec N-CAM (*neural cell adhesion molecule*), suggère qu'il puisse lui-même servir de molécule d'adhérence (Heller *et al.*, 2003). Son expression est couplée à celle d'ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) dans des cellules endothéliales cérébrales infectées par le virus murin de l'hépatite (Joseph *et al.*, 1993). Exprimé à la surface des érythrocytes, il servirait à la mise

en recirculation des érythrocytes matures de la rate vers la circulation périphérique. Il est alors considéré comme une molécule d'adhérence capable d'interagir avec un éventuel récepteur (Coste *et al.*, 2001). Des interactions homophiliques entre des molécules de CD147 peuvent se former soit entre cellules de même type ou non. Ces interactions se font grâce au domaine N-terminal et suggèrent un rôle du CD147 dans la formation de contact cellule-cellule (Fadool & Linser, 1996 ; Yoshida *et al.*, 2000 ; Sun & Hemler, 2001).

Le CD147 participe également à l'activation des intégrines. Certains anticorps anti-CD147 induisent l'agrégation homotypique des cellules monocytaires U937 *via* l'activation de la voie LFA-1 (*leucocyte function-antigen-1*) / ICAM-1, ce qui se traduit par l'activation de MAPK et la réorganisation du cytosquelette (Kasinrerk *et al.*, 1999 ; Khunkeawla *et al.*, 2001). Cho *et al.* (2001) ont confirmé ces résultats en démontrant qu'il est associé aux intégrines de type  $\beta 1$  et au CD98. L'utilisation d'un anticorps activateur du CD98 induit l'agrégation homotypique des cellules U937. Ce phénomène traduit l'activation des intégrines et est inhibé en présence d'anticorps bloquants anti-CD147. Ces mêmes auteurs ont montré que cette agrégation homotypique est dépendante de l'activation de p44/p42 MAPK et de la PKC $\delta$ , soulignant la participation de l'association CD98/CD147 dans l'activation de voies de signalisation (Cho *et al.*, 2003). L'interaction entre le CD147 et le CD98 est également impliquée dans la fusion cellulaire et la formation d'ostéoclastes (Mori *et al.*, 2004).

#### **B. 4. Le CD147, une protéine régulatrice**

En plus de ses fonctions dans la production de MMPs et dans l'adhérence, le CD147 agit comme molécule auxiliaire car il s'associe à d'autres molécules pour réguler leur activité ou leur transport à la membrane. Ainsi, il est retrouvé associé aux MCT (*monocarboxylate transporter*). Ces transporteurs régulent les échanges de monocarboxylates endogènes comme le lactate et le pyruvate au travers des membranes. Ces produits sont essentiels au bon fonctionnement cellulaire car ce sont des intermédiaires de voies métaboliques. Neuf isoformes sont caractérisées chez les mammifères et des formes orthologues sont décrites chez de nombreuses espèces. Ce sont des protéines d'environ 55 kDa dont la distribution est tissu-spécifique. Elles s'enchâssent dans la membrane grâce à leurs 12 domaines transmembranaires. Leur importance physiologique et leur nature hydrophile nécessitent la présence de protéines accessoires comme le CD147 pour être convenablement présentées à la membrane (Halestrap & Price, 1999 ; Enerson & Drewes, 2003). Une telle coopération a déjà été décrite entre le CD98 et les transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (HAT) (Nakamura *et al.*, 1999). Des expériences de co-immunoprécipitation et de microscopie à

fluorescence ont démontré l'association du CD147 avec les MCT-1 et -4 (Kirk *et al.*, 2000 ; Wilson *et al.*, 2002). Récemment, Manoharan *et al.*, (2006) ont montré que l'association se fait entre le résidu Arg<sup>306</sup> du domaine transmembranaire 8 du transporteur et le résidu Glu<sup>218</sup> du domaine transmembranaire du CD147. Le CD147 intervient également comme sous-unité régulatrice de la  $\gamma$ -sécrétase, une aspartyl protéase impliquée notamment dans le clivage du précurseur du peptide de l'amyloïde (APP) (Zhou *et al.*, 2005 ; 2007). Une fois de plus, l'interaction s'expliquerait par la présence du résidu chargé du domaine transmembranaire du CD147, confirmant son rôle dans les activités du CD147.

La participation du CD147 à ces complexes lui permet d'être impliqué dans de nombreux processus biologiques. Par ailleurs, l'expression du CD147 est fortement augmentée sur les lymphocytes T activés. Lors de travaux sur les souris invalidées pour le CD147, Ishigura *et al.* (1996) ont constaté que la prolifération des lymphocytes issus de ces animaux était plus importante que celle issue de souris normales. Ces données ont suggéré un rôle régulateur du CD147 dans l'activation des lymphocytes. De nombreux travaux ont par la suite confirmé cette hypothèse. Dès 1999, Koch *et al.* ont montré qu'un anticorps dont l'épitope se situe sur le domaine proximal du CD147 inhibe la prolifération cellulaire induite par l'activation du CD3. Ils suggèrent que le CD147 doit s'oligomériser pour avoir cet effet régulateur. La membrane plasmique est compartimentée en domaines appelés *lipids rafts* où se créent des associations/dissociations de récepteurs et de molécules de signalisation selon l'état d'activation cellulaire. Ce phénomène permet la régulation de la signalisation, notamment celle induite par le TCR. La fixation d'anticorps anti-CD147 inhibe la réorganisation de ces domaines, ce qui s'associe à une diminution de l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (Staffler *et al.*, 2003). La localisation de l'épitope responsable de cette activité n'est pas encore établie. En effet, les travaux de Chiampanichayakul *et al.* (2006) suggèrent que d'autres anticorps reconnaissant le domaine Ig distal auraient cette même activité inhibitrice. Ainsi, les épitopes impliqués dans l'agrégation homotypique et dans la régulation négative de la prolifération lymphocytaire seraient différents mais portés par le même domaine. Pour ces auteurs, l'inhibition de la prolifération passerait par la diminution de l'expression du CD25 et de l'IL-2 elle-même.

D'autres équipes ont rapporté un effet anti-prolifératif du CD147 en utilisant comme modèle un système de co-culture entre lymphocytes et cellules stimulatrices comme les monocytes U937 ou les cellules dendritiques. Ils démontrent que l'incubation de l'anticorps avec les cellules co-stimulatrices est suffisant pour avoir un effet sur les lymphocytes (Stonehouse *et al.*, 1999 ; Woodhead *et al.*, 2000). Les travaux de Staffler *et al.* (2003) et Chiampanichayakul *et al.* (2006) infirment cette hypothèse puisque l'effet qu'ils observent

existe après déplétion d'éventuelles cellules co-stimulatrices présentes. Les travaux sur les lymphocytes ont également souligné l'implication du récepteur dans l'expansion clonale des thymocytes. La fixation d'un anticorps anti-CD147 sur des thymocytes immatures empêche leur maturation (Renno *et al.*, 2002)

## **B. 5. Interaction entre les cyclophilines et le CD147**

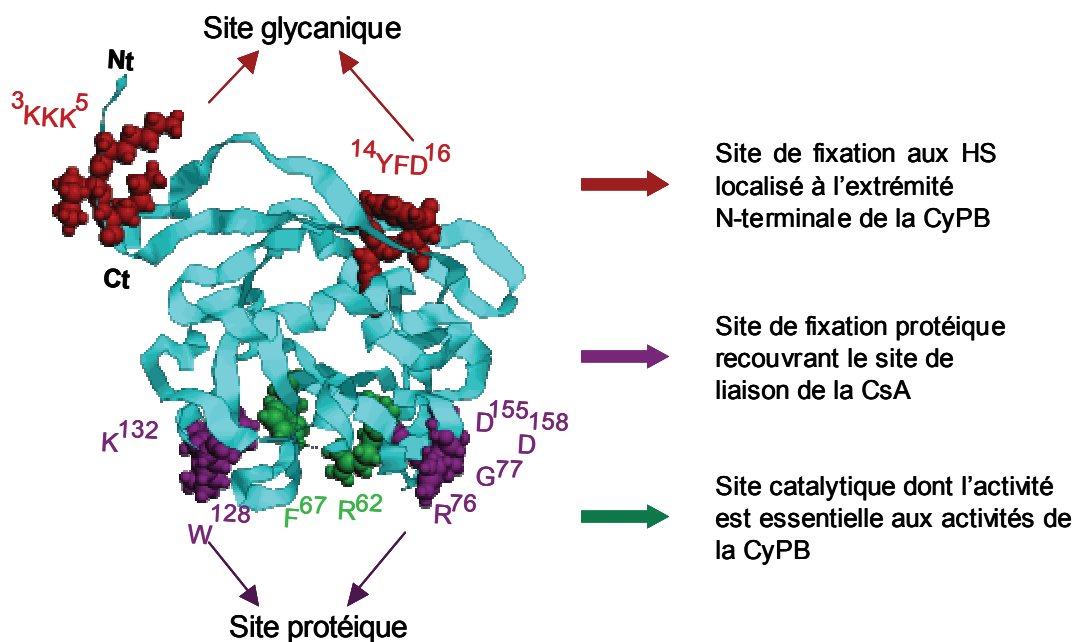
La fixation de la CyPB sur les sites protéiques présents à la surface d'un lymphocyte T est caractérisée par un Kd de  $14 \pm 4$  nM et le nombre de sites est égal à  $25000 \pm 10000$  (Denys *et al.*, 1998a). Cette fixation de la CyPB induit une internalisation rapide du récepteur lymphocytaire, suggérant que le site de type I est un récepteur protéique fonctionnel. Une fois internalisée, la CyPB est dégradée dans des vésicules acides et relarguée dans le milieu extracellulaire (Allain *et al.*, 1996 ; Denys *et al.*, 1998a).

Des travaux réalisés afin d'identifier le récepteur protéique ont été entrepris dans notre Laboratoire. L'isolement de protéines affines par ligand immobilisé ou le couplage ligand/récepteur par des composés bifonctionnels ont permis de caractériser un complexe formé par au moins trois protéines différentes non identifiées. Cependant, seule la sous unité de 75 kDa s'est révélée être directement impliquée dans les interactions. Ces données suggèrent que la partie protéique du récepteur est en elle-même un complexe multimérique. Une des sous-unités permettrait la fixation alors que les autres seraient impliquées dans la transduction du signal à l'origine des différentes activités de la CyPB. Malheureusement, ces travaux n'ont pas permis d'identifier le récepteur.

Le complexe CyPB/CsA est incapable de se fixer sur le site de type I alors que l'interaction avec le second site est conservée. Ces données suggèrent que la région centrale conservée des cyclophilines est impliquée dans la fixation au récepteur protéique (Allain *et al.*, 1996 ; Denys *et al.*, 1998a). Cette constatation a conduit Carpentier *et al.* (1999a) à rechercher les acides aminés nécessaires à la fixation au récepteur protéique.

L'utilisation de CyPB mutées a montré que les résidus R<sup>62</sup> et F<sup>67</sup> sont impliqués dans l'activité PPIase alors que le résidu W<sup>128</sup> affecte la fixation au récepteur protéique et à la CsA. Ces résultats sont en accord avec ceux de Zydowsky *et al.* (1992) qui démontraient que la fixation de la CsA à la CyPA recouvre partiellement le site enzymatique. Ainsi, le domaine de fixation au récepteur serait distinct du site enzymatique mais recouvrirait partiellement celui de la CsA (Carpentier *et al.*, 1999a). Ce résidu est conservé entre les cyclophilines, suggérant que les isoformes proches de la CyPB pourraient se fixer au site de type I. 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. Pour vérifier cette hypothèse, d'autres acides aminés localisés à proximité du site de liaison de la CsA et susceptibles d'expliquer la spécificité de fixation de la CyPB aux sites de type I ont été recherchés. La modification par mutagenèse dirigée des résidus R<sup>76</sup>, G<sup>77</sup>, K<sup>132</sup>, D<sup>155</sup> et D<sup>158</sup> réduit fortement la fixation de la CyPB sur son récepteur protéique. Il est à noter que la CyPB est la seule isoforme à posséder intégralement ces cinq acides aminés, ce qui explique l'affinité élevée de la protéine pour son récepteur. 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 impliquée dans la fixation aux sites de type I recouvre le site de liaison à la CsA. Bien que ce domaine soit très conservé entre les cyclophilines, des différences de séquence mineures seraient responsables de la spécificité de reconnaissance de la CyPB (Figure 8).



**Figure 8:** Identification des régions de la CyPB impliquées dans l'activité enzymatique et dans la fixation aux chaînes HS et au récepteur protéique.

Parallèlement à ces travaux, d'autres équipes ont identifié le CD147 comme étant le récepteur des cyclophilines. Néanmoins, aucune interaction directe n'a pu être caractérisée entre le CD147 et les cyclophilines. Alors que la CyPB induit l'internalisation rapide de son récepteur, aucune diminution de l'expression membranaire du CD147 n'a été observée suite à la fixation de la CyPB. Les auteurs expliquent l'incapacité de mesurer un kD par une faible

affinité. L'interaction serait équivalente à celle d'une enzyme pour son substrat (Allain *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2002). Le CD147 serait un élément du complexe récepteur essentiel à la transduction du signal induit par les cyclophilines. En effet, les travaux de Yurchenko *et al.* (2002) ont montré que l'interaction entre la CyPA et le CD147 conduit à la génération d'un flux calcique et à l'activation de la voie p44/p42 MAPK. Ces effets sont inhibés par des anticorps bloquants anti-CD147. Une forme de CyPB mutée au niveau de son site enzymatique (CyPB-R<sup>62</sup>) est incapable d'induire l'adhérence des cellules à la fibronectine, ce qui laisse supposer que l'activité PPIase est impliquée dans les réponses cellulaires (Carpentier *et al.*, 2002). Par ailleurs, le CD147 contient un résidu de proline (Pro<sup>180</sup>) accessible. En induisant l'isomérisation de cette liaison, les cyclophilines induiraient des modifications conformationnelles à l'origine de l'activation du flux calcique et de la voie p44/p42 MAPK (Allain *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2002).

Les cyclophilines A et B sont fortement sécrétées lors de processus inflammatoires, notamment dans l'arthrite rhumatoïde. L'utilisation d'anticorps bloquants, de peptides antagonistes ou de dérivés non-immunosuppresseurs de CsA inhibe les réponses cellulaires dépendantes du CD147 dans cette pathologie comme dans des cas d'asthme allergique ou d'inflammation aiguë du poumon. Ces données suggèrent que le CD147 participe au développement de la maladie par sa fonction de récepteur des cyclophilines (Arora *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2005 ; Gwinn *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données démontrent que le récepteur protéique de la CyPB est composé de plusieurs sous-unités dont chacune a une fonction définie. Elle se fixe par l'intermédiaire de certains résidus d'acides aminés à une molécule encore inconnue à ce jour, ce qui permet à son site enzymatique d'interagir avec le CD147. De l'isomérisation du CD147 naît l'activation de voies de signalisation à l'origine des réponses cellulaires caractérisées. Par ailleurs, les travaux réalisés au Laboratoire ont démontré l'existence d'un autre site de fixation de la CyPB représenté par les chaînes héparanes sulfates portées par les protéoglycanes membranaires.

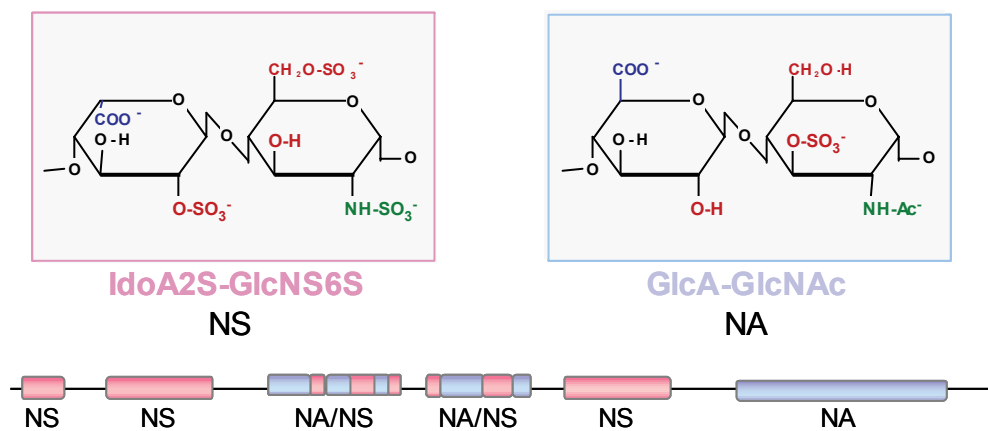
### **C/ Les protéoglycanes membranaires, des récepteurs pour les cyclophilines ?**

Les protéoglycanes sont retrouvés dans la plupart des tissus animaux et sont classés en fonction de leur localisation cellulaire. Ainsi, il existe des protéoglycanes intracellulaires telle que la serglycine, solubles tels que l'aggrecan et le versican, et des formes membranaires. Sur

la base de considérations structurales, quatre familles de HSPG membranaires ont été décrites, les syndécans et les glypicans, le CD44v3 et le bétaglycan.

Ils sont constitués d'un axe protéique appelé « core » sur lequel viennent se greffer de manière covalente de longues chaînes polysaccharidiques nommées glycosaminoglycanes (GAGs). Ces chaînes sont linéaires et formées de la répétition d'une unité disaccharidique. Selon la nature des monosaccharides constituant le motif disaccharidique, plusieurs types de GAGs ont été décrits, l'héparine et les héparanes sulfates ; les chondroïtanes et les dermatanes sulfates et enfin les kératanes sulfates.

Dans le cas des chaînes HS ou de l'héparine, il s'agit de l'enchaînement du motif : [acide-D-glucuronique/acide-L-iduronique  $\beta/\alpha$  1,4 glucosamine  $\alpha$ -1,4]. Ces chaînes polysaccharidiques subissent des modifications enzymatiques donnant naissance à des domaines plus ou moins N-sulfatés appelés domaines NA (N-acétylés) et NS (N-sulfatés) séparés par des domaines intermédiaires NA/NS (Figure 9). La distribution et la taille de ces domaines varient en fonction de l'espèce, du type cellulaire et tissulaire, du stade de développement et de l'état d'activation cellulaire (Gallagher, 2001 ; Turnbull, 2001 ; Esko & Selleck, 2002).



**Figure 9** : Exemples de disaccharides constituant les chaînes HS à l'origine de l'organisation en domaines NA, NS, NA/NS (d'après Lopes *et al.*, 2006).

### C. 1. Les chaînes héparanes sulfates

L'interaction entre les HS et les protéines est liée à un phénomène électrostatique entre les domaines sulfatés des GAGs et les régions cationiques des protéines, notamment au niveau de leurs résidus basiques comme les lysines, les arginines et plus rarement les histidines. Il existe des centaines de protéines capables de se lier aux GAGs. Le terme HBP

(*heparin binding protein*) est utilisé pour répertorier celles qui fixent l'héparine et par homologie les chaînes HS. Par ailleurs, il est apparu que certaines d'entre elles se fixent de façon spécifique, démontrant l'existence de séquences glycaniques bien définies. Ces motifs de fixation sont déterminés par leur taille, leur niveau de sulfatation et l'existence de domaines NS, NA, ou NA/NS. Ces interactions déterminent les nombreuses fonctions attribuées aux HS.

### C. 1.1. Biosynthèse des chaînes HS

L'existence de multiples motifs de fixation pour les HBPs implique que la biosynthèse des chaînes HS soit un événement complexe et régulé. Elle se déroule essentiellement dans l'appareil de Golgi grâce à l'action concertée et séquentielle de nombreuses glycosyltransférases (Esko & Selleck, 2002). La première étape est la formation du tétrasaccharide: (GlcUA $\beta$ -1,3Gal $\beta$ -1,3Gal $\beta$ -1,4Xyl) greffé sur les séquences Ser-Gly des cores protéiques. Ces séquences de tailles variables sont flanquées de résidus d'acides aminés acides favorisant la probabilité d'insérer une chaîne HS. (Figure 10) (Gallagher & Lyon, 2000 ; Esko & Lindahl, 2001 ; Withelock & Iozzo, 2005). L'élongation de la chaîne s'effectue ensuite par l'ajout successif de résidus de GlcNac et GlcA pour aboutir à la formation d'un polymère linéaire N-acétylé (Esko & Lindahl, 2001). Cette réaction est catalysée par les copolymérases EXT1 et EXT2. L'existence d'une troisième forme, EXT3, impliquée dans l'initiation et l'élongation de la chaîne a été décrite (Kim *et al.*, 2001). La longueur des chaînes dépend du type cellulaire ; en général, elles font de 40 à 160 unités. Le processus de terminaison de la chaîne est mal connu. La chaîne peut d'ailleurs se terminer par un résidu d'acide glucuronique ou de N-acétylglucosamine (Esko & Selleck, 2002).

Ce polymère est ensuite modifié par une série de réactions enzymatiques séquentielles où les produits d'une réaction deviennent le substrat de la suivante. L'ensemble de ces réactions est à l'origine de la grande hétérogénéité structurale. La première modification consiste en l'action d'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 (NDST-1 à -4) ont été décrites (Esko & Selleck, 2002). L'expression de ces isoformes est également dépendante du type cellulaire. Toutefois, le ratio activité N-déacétylase/activité N-sulfotransférase est variable selon les isoformes. Par exemple, la NDST-3 présente une activité N-déacétylase plus importante que son activité N-sulfotransférase.



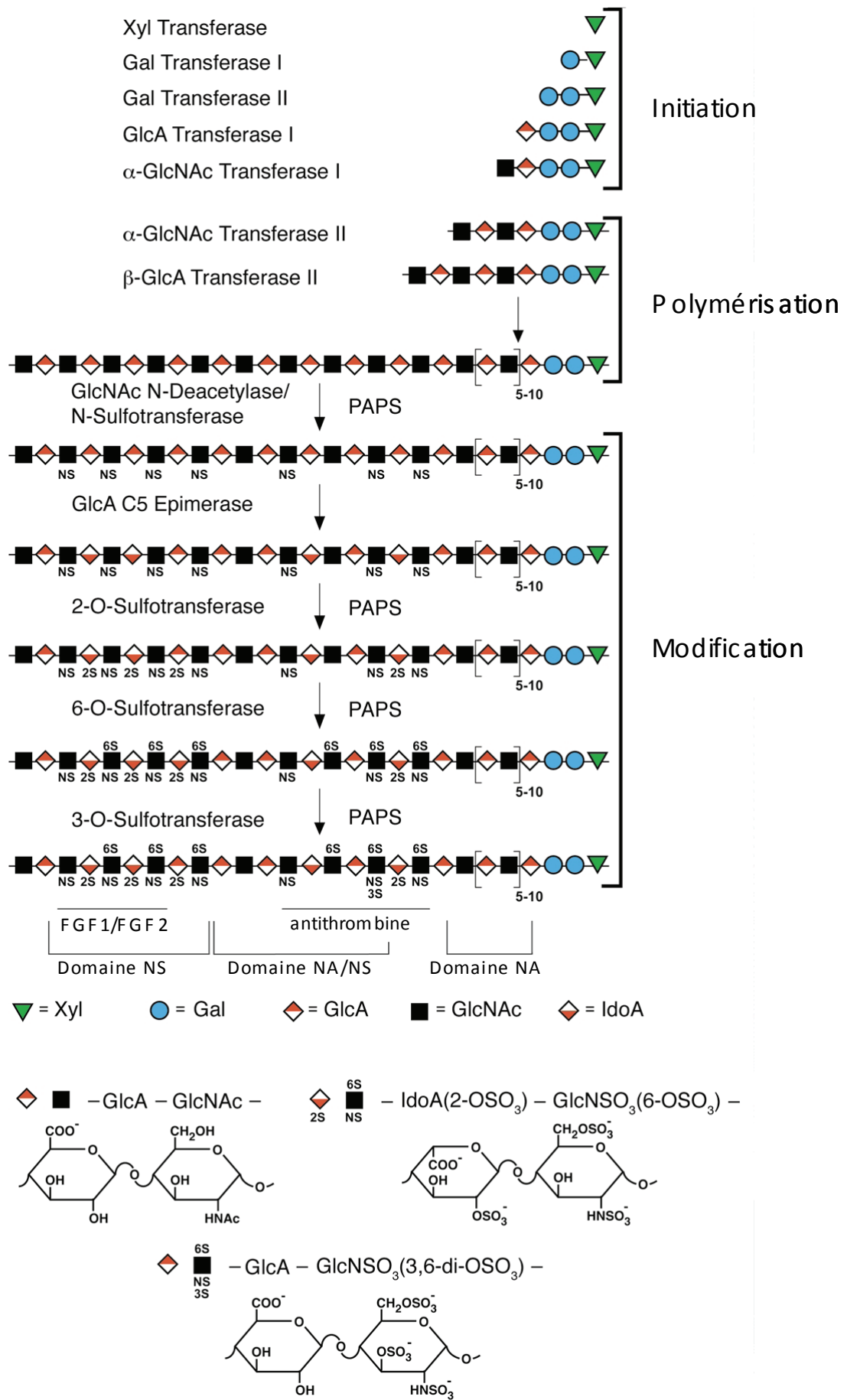


Figure 10 : Schéma de synthèse des chaînes HS (d'après Esko & Lindahl, 2001).

Après action de ces enzymes, les glucosamines se retrouvent N-sulfatées et constituent un signal pour l'action des autres enzymes de biosynthèse. Dès lors, des acides D-glucuroniques situés à l'extrémité réductrice de résidus de glucosamines N-sulfatées peuvent subir l'action de la 5'-glucuronosyl-épimérase et devenir des acides L-iduroniques (Hagner-McWhirter *et al.*, 2000). L'acide iduronique a la particularité d'adopter plusieurs conformations pyranosiques, ce qui apporte une plus grande flexibilité à la chaîne polyosidique et facilite ainsi les interactions avec les HBPs (Mulloy & Forster, 2000 ; Esko & Selleck, 2002). Enfin, les chaînes héparanes sulfates subissent l'action de sulfotransférases sur leurs résidus hydroxyles. Comme toutes sulfotransférases, elles fixent le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) et transfèrent le sulfate sur un groupement approprié. L'uronosyl-2-O-sulfotransférase (2-OST) agit à la fois sur les acides glucuroniques et iduroniques. La présence de groupements sulfatés en position 6 des glucosamines est dépendante de l'action de trois glucosaminyl-6-O-sulfotransférases (6-OST-1 à -3) alors que la 3-O-sulfatation est catalysée par sept isoformes de glucosaminyl-3-O-sulfotransférases (Shworak *et al.*, 1997 ; Shworak *et al.*, 1999 ; Xia *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2005). La 3-O-sulfatation des résidus de glucosamine est une modification fondamentale durant la biosynthèse des héparanes sulfates car elle permet la fixation spécifique de certaines protéines comme l'antithrombine III et la glycoprotéine gD de l'*Herpes simplex virus* (HSV) (Kusche *et al.*, 1991 ; Shworak *et al.*, 1997 ; Shukla *et al.*, 1999 ; Petitou *et al.*, 2003 ; Tiwari *et al.*, 2005).

Certaines glucosamines des chaînes héparanes sulfates semblent échapper au processus de sulfatation au cours de la biosynthèse et reste sous la forme NH<sub>2</sub>. En fonction de l'origine des chaînes héparanes sulfates, le pourcentage de fonction amine libre varie de 0,7 à 4 % (Westling & Lindahl, 2002). Plusieurs théories expliquent la présence de ces résidus non substitués. Quelques résidus de glucosamines N-acétylées initialement présents dans le précurseur pourraient échapper au processus de N-déacétylation/N-sulfatation. Les groupements acétyles pourraient être enlevés sélectivement ou les groupements N-sulfates pourraient subir l'action d'endosulfamidase. Ces phénomènes pourraient se produire pendant ou après les étapes de modifications. De telles enzymes n'ont pas encore été décrites, mais il existe des endosulfatases membranaires ou extracellulaire Hsulf-1 et Hsulf-2 qui agissent spécifiquement sur les groupements 6-O-sulfates des glucosamines (Morimoto-Tomita *et al.*, 2002). Sur les quatre N-déacétylase/N-sulfotransférases décrites, la NDST-3 a une activité N-déacétylase beaucoup plus élevée que son activité N-sulfotransférase (Aikawa *et al.*, 2001), suggérant que cette enzyme pourrait être à la base de la formation des résidus de glucosamine libre.

Théoriquement, l'ensemble de ces modifications engendre 48 disaccharides différents. Or, seulement 23 disaccharides ont été identifiés car la spécificité des enzymes de biosynthèse impose des restrictions dans le réarrangement des disaccharides. Toutefois, ce nombre est suffisant pour former des milliards de combinaisons donnant naissance à un grand nombre de structures différentes à l'intérieur même des chaînes. (Delehedde *et al.*, 2001 ; Esko & Selleck, 2002). Ces modifications sont à l'origine de la formation des domaines NA, NS et NA/NS impliqués dans le recrutement des protéines (Lyon & Gallagher, 1998 ; Gallagher, 2001). Cette voie de biosynthèse suggère que les chaînes HS d'une cellule présentent les mêmes caractéristiques quelque soit le type de core protéique.

### C. 1.2. Spécificité de reconnaissance

L'expression des enzymes de biosynthèse varie en fonction du type cellulaire et des conditions physiologiques comme le stade de développement, la différenciation cellulaire ou lors de processus pathologiques comme le cancer et l'inflammation. La machinerie de biosynthèse n'est pas un système figé mais dynamique dans sa fonction comme dans sa régulation. Ainsi, en régulant l'expression de certaines enzymes, une cellule peut moduler la fixation de certains ligands et favoriser certaines réponses biologiques (Delehedde, 2002a).

Les études visant à identifier les motifs reconnus spécifiquement par certaines protéines a révélé l'importance de cette voie de biosynthèse. Le pentasaccharide fixant l'anti-thrombine III contient un groupement 3-O-sulfate sur le résidu glucosamine N-sulfatée central essentiel à l'activité anti-coagulante de la protéine (Petitou *et al.*, 2003). Un très bel exemple décrit récemment est le motif de fixation de la protéine gD du virus du HSV-1 (*herpès virus simplex*). Il s'agit d'un octasaccharide contenant le motif [IdoA2S-GlcNH<sub>2</sub>3S<sup>+/-</sup>6S] qui est rare du fait de sa complexité mais nécessaire à l'entrée du virus dans les cellules (Shukla *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2002).

L'étude d'un motif de reconnaissance commence par la détermination de sa taille minimale. Le FGF-2 fixe un tétrasaccharide (Delehedde *et al.*, 2002b). Toutefois, la taille minimale nécessaire à la fixation ne correspond pas forcément à celle responsable des activités biologiques. L'activité mitogène du FGF-2 nécessite un fragment de degré de polymérisation (dp) 10 ou 12. De même, les protéines homodimériques interagissent avec deux domaines NS séparés par un domaine NA. Le domaine NA apporte la flexibilité nécessaire pour que les domaines NS interagissent spécifiquement avec chaque monomère (Gallagher *et al.*, 2001). L'activité du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), de l'IL-8, de l'IFN- $\gamma$  ou encore de Rantes dépend de leur dimérisation et de leur fixation sur deux motifs

séparés par un court fragment non sulfaté (Lortat-Jacob *et al.*, 1995 ; Spillmann *et al.*, 1998 ; Vivès *et al.*, 2002 ; Robinson *et al.*, 2006). La détermination des motifs spécifiques permettrait l'élaboration d'héparanes sulfates de synthèse antagonistes. Ces composés pourraient être utilisés dans le traitement de certaines pathologies comme le cancer, les maladies inflammatoires et l'infection virale par le HSV et le HIV (Spillmann, 2001). Ainsi, la synthèse chimique de motifs hépariniques a montré que les activités de l'IFN- $\gamma$  sont inhibées *in vitro* par un composé constitué de 2 octamères NS séparés par un segment NA de degré de polymérisation 10. L'inhibition de la fixation de l'IFN- $\gamma$  sur son récepteur protéique et par la même des réponses biologiques suggère l'utilisation de ce composé pour le traitement de pathologies où l'IFN- $\gamma$  joue un rôle central. Ces composés obtenus peuvent être synthétisés en quantité et en grande pureté et ainsi être utilisés à visée médicale. Néanmoins, la position des sulfates reste à être déterminée de façon à augmenter la spécificité du composé *in vivo* (Sarrazin *et al.*, 2005).

### C. 1.3. Activités associées aux chaînes HS

Les chaînes HS interagissent avec un grand nombre de molécules allant des constituants de la matrice extracellulaire aux facteurs de croissance et cytokines, impliquant les protéoglycanes dans de nombreux processus biologiques (Bernfield, 1999 ; Delehedde *et al.*, 2002a). Les interactions avec différents constituants de la matrice comme la fibronectine, la laminine ou encore le collagène permet l'ancrage des cellules. Les facteurs solubles comme les chimiokines, les cytokines et les facteurs de croissance se fixent aux chaînes HS, ce qui module leur devenir et leur activité. En effet, l'élimination des chaînes HS par traitement à l'héparinase, l'inhibition d'expression des motifs de fixation par le chlorate ou par l'invalidation des enzymes biosynthèse induisent la perte de l'activité proliférative du FGF-2. Le facteur de croissance se fixe toujours sur son récepteur protéique, mais induit un signal de faible intensité insuffisant pour permettre la réponse cellulaire. L'ajout de chaînes HS solubles restaure l'activité mitogénique car les signaux cellulaires deviennent soutenus (Delehedde, 2000). Ainsi, les chaînes HS permettent une réponse optimale des cellules. Ce rôle des chaînes HS a été décrit pour d'autres protéines comme l'IL-8, où la chaîne HS maintient l'interaction entre la cytokine et son récepteur. Ainsi, en se fixant sur les chaînes HS, le ligand se retrouve présenté à son récepteur, ce qui conduit à la formation d'un complexe ternaire responsable de la signalisation. Il est à noter que ce système peut également fonctionner entre les chaînes HS d'une cellule et le récepteur présent sur une autre cellule (Kramer & Yost, 2003).

L'interaction des chimiokines avec les héparanes sulfates n'est pas nécessaire au chimiotactisme induit *in vitro*. En revanche, les travaux de Proudfoot *et al.* (2003) ont montré que la fixation des chimiokines Rantes, MCP-1 et MIP-1 $\beta$  aux chaînes HS est indispensable à leur activité *in vivo*. En fixant les chimiokines *via* leurs chaînes HS, les cellules endothéliales empêchent leur diffusion dans le flux sanguin et les protègent de la dégradation. Ces protéines ainsi immobilisées se retrouvent concentrées à proximité du lieu de leur sécrétion, permettent le recrutement de leucocytes circulants et leur extravasation vers le site de l'inflammation. De plus, les chaînes HS participent au recrutement des leucocytes en interagissant avec les molécules d'adhérence leucocytaires comme les P- et L-sélectines et ICAM-1 (Götte, 2003).

En plus de leur fonction de présentation, les chaînes HS participent au stockage et à la protection des facteurs inflammatoires. Au moment opportun, ces facteurs pourront être massivement libérés par dégradation des chaînes HS et redevenir actifs. Cette libération se produit lors du remodelage tissulaire lié à la morphogenèse, à l'inflammation ou encore au cancer et se fait soit par clivage des chaînes HS par les héparanases qui sont des  $\beta$ -endoglycosidases sécrétées par les plaquettes, les cellules inflammatoires et tumorales, soit par clivage du core protéique par des MMPs sécrétées par les cellules inflammatoires (Götte, 2003)

Malheureusement, les facteurs inflammatoires et les molécules d'adhérence ne sont pas les seuls à profiter des chaînes HS. Différents agents pathogènes les utilisent pour pénétrer dans les cellules (Spillman, 2001). Les parasites de type *Plasmodium falciparum*, les bactéries du genre *Chlamydia* ou encore les virus comme HIV-1, HSV-1 ou celui de la Dengue peuvent se fixer aux chaînes HS (Barragan *et al.*, 1999 ; Sapphire *et al.*, 1999 ; Shukla *et al.*, 1999 ; Hilgard P. & Stockert R., 2000 ; Taraktchoglou *et al.*, 2001). La protéine gD du virus HSV-1 reconnaît un motif spécifique sur les chaînes HS nécessaire à l'entrée du virus dans les cellules (Shukla *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2002 ; Tiwari *et al.*, 2005). De nombreux travaux ont porté sur le rôle des HSPG dans l'entrée du HIV-1. Une interaction entre la CyPA fixée sur les syndécans et des résidus basiques de la gp120 du virus a même été suggérée (Sapphire *et al.*, 1999). Toutefois, la participation des chaînes HS ne serait pas essentielle pour l'infection de tous les types cellulaires. Elle permettrait l'attachement des virus sur des cellules présentant de faibles taux de CD4, récepteur cellulaire du HIV ou sur des cellules non infectables par le virus. Par ailleurs, les cellules endothéliales, grâce à leurs longues chaînes HS, serviraient de réservoir viral. Le virus protégé de la dégradation, est prêt à infecter des cellules circulantes comme les lymphocytes T (Ibrahim *et al.*, 1999 ; Bobardt *et al.*, 2003 ; Gallay, 2004).

## C. 2. Structure et fonctions des protéoglycanes membranaires

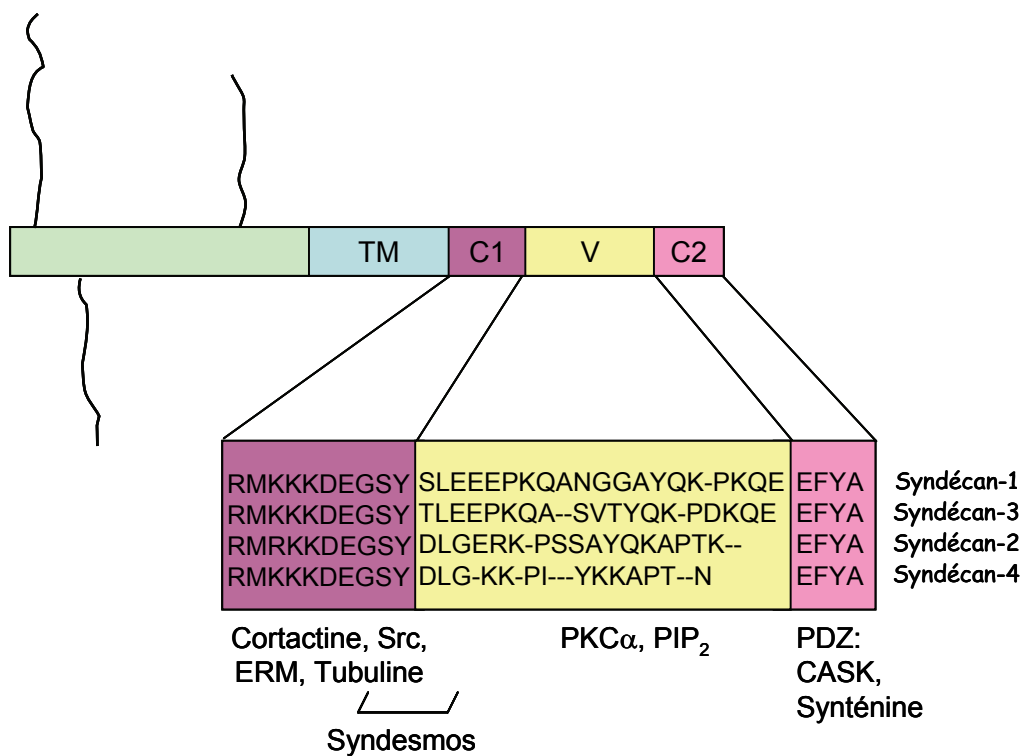
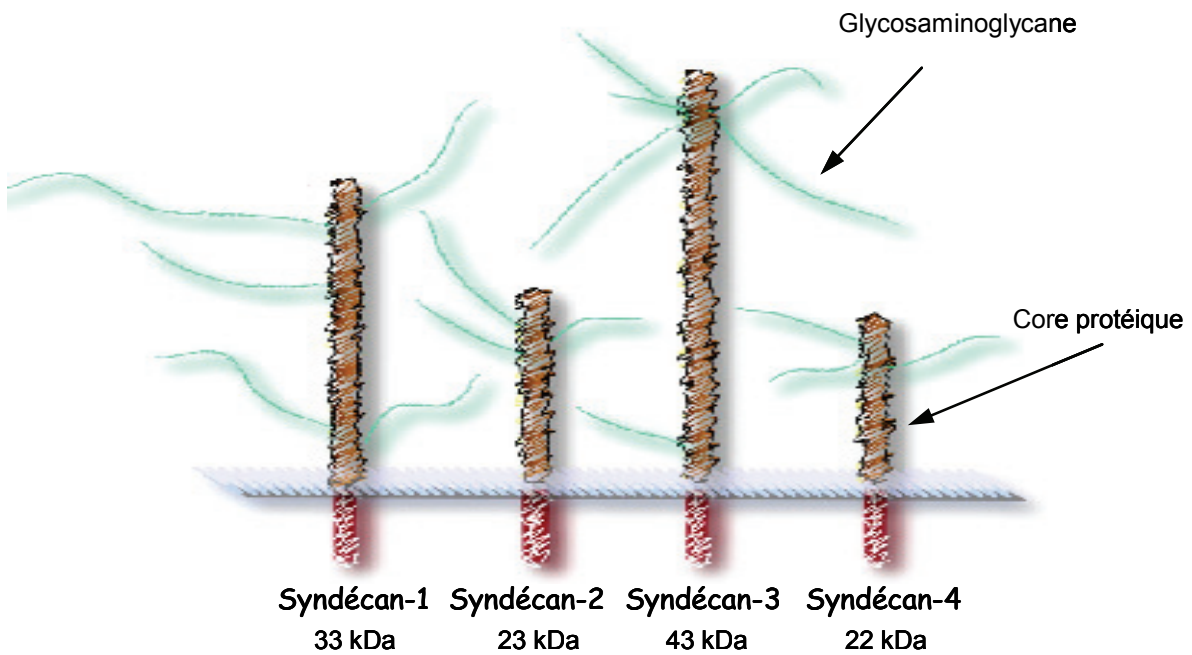
Parallèlement aux fonctions associées aux HS, les travaux réalisés ces dernières années montrent que le core protéique n'a pas pour seule fonction de porter les chaînes. Bien que dépourvus d'activité kinase intrinsèque, les HSPG membranaires sont capables d'induire l'activation de voies de signalisation, leur conférant d'autres fonctions. Nous allons donc passer en revue les différentes classes de protéoglycanes membranaires et leurs principales fonctions.

### C. 2.1. Les syndécans

#### a) structure et expression

Chez les vertébrés, cette famille est composée de quatre protéoglycanes transmembranaires codés par des gènes différents (syndécan -1 à -4) (Bernfield *et al.*, 1999). Par comparaison de la séquence de la forme décrite chez la Drosophile et des localisations géniques, il semble qu'au cours de l'évolution le gène ancestral se soit dupliqué et ait évolué. Les syndécan-1 et -3 et les syndécan-2 et -4 formeraient deux sous-familles. Leur expression est hautement régulée et dépend du type cellulaire, de l'état d'activation et du stade de développement. Chaque type cellulaire exprime au moins un syndécan mais la plupart des cellules expriment plusieurs isoformes. Toutefois, le syndécan-1 est majoritairement exprimé à la surface des cellules épithéliales, mésenchymateuses, des lymphocytes pré-B et des plasmocytes. Le syndécan-2 est abondant au niveau des cellules endothéliales et des fibroblastes. Le syndécan-3, appelé aussi N-syndécan, est caractéristique des cellules nerveuses, mais il est également détecté dans les muscles squelettiques. Enfin, le syndécan-4 est exprimé de façon plus ubiquitaire mais souvent en quantité plus faible que ses homologues (Bernfield *et al.*, 1992 ; 1999 ; Couchman, 2003 ; Wang & Heitman, 2005 ; Alexopoulou *et al.*, 2006).

Les syndécans (MM= 23-43 kDa) sont formés d'un ectodomaine qui porte les chaînes GAGs, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique court (Figure 11). Alors que les domaines transmembranaire et cytoplasmique sont très conservés (60 à 70 % d'homologie), les domaines extracellulaires ou ectodomains varient d'une forme à l'autre. Entre chaque syndécan, les domaines extracellulaires ne présentent que 10 à 20 % d'homologie à l'exception des sites permettant l'attachement des chaînes GAGs ou le clivage protéolytique qui sont conservés. Ces sites d'attachement sont au nombre de 3 à 5 et sont formés par une succession de 2 ou 3 séquences Ser-Gly entourés par des résidus acides ou hydrophobes. Les syndécans portent principalement des chaînes HS mais les sites proches de



**Figure 11:** Représentation schématique des syndécans et structure des domaines cytoplasmiques impliqués dans le recrutement de protéines du cytosquelette ou de signalisation (d'après Tchachenko *et al.*, 2005 ; Lopes *et al.*, 2006).

la membrane plasmique peuvent également être substitués par des chaînes chondroïtanes sulfates (CS). La présence de ces chaînes dépend du type cellulaire (Bernfield *et al.*, 1999 ; Ueno *et al.*, 2001). L'ectodomaine peut être clivé à proximité de la membrane plasmique par des métalloprotéinases, la plasmine ou encore la thrombine ou l'élastase. Le domaine libéré conserve sa capacité à fixer des ligands par l'intermédiaire des chaînes GAGs (Kato *et al.*, 1998 ; Endo *et al.*, 2003 ; Wang & Heitman, 2005).

Le domaine transmembranaire très conservé, contient des régions impliquées dans des interactions avec d'autres protéines membranaires et dans la localisation du protéoglycane dans la membrane plasmique. De plus, il participe à l'oligomérisation des syndécans même en l'absence de ligand. En effet, des complexes résistants au SDS ont été caractérisés. La formation de ces multimères permet de créer une zone riche en HS dans une zone de la membrane plasmique (Asundi & Carey, 1995 ; Choi *et al.*, 2005 ; Lopes *et al.*, 2006).

Malgré sa petite taille (30 acides aminés), le domaine cytoplasmique des syndécans est subdivisé en trois parties. Deux parties conservées C1 et C2 entourent une région variable, le domaine V. Cette structure suggère que le domaine cytoplasmique est à l'origine de fonctions communes comme spécifiques pour chacune des isoformes. En terme de fonction commune, le domaine C1 fixe des protéines de la famille des FERM (*protein 4.1, ezrin, radixin, moesin*) qui sont des adaptateurs du cytosquelette (Woods & Couchman 1998 ; Zimmermann & David, 1999 ; Wang & Heitman, 2005). De plus, des travaux réalisés sur le syndécan-3 montrent qu'il interagit avec les kinases c-Src et Fyn, la cortactine et la tubuline grâce à son domaine C1, suggérant que cette activité est partagée par tous les syndécans (Kinnunen *et al.*, 1998b). Ces données suggèrent l'implication des syndécans dans des phénomènes de réarrangements du cytosquelette. Récemment, la méthode de double hybride dans des cellules NIH3T3 utilisée par Yoo *et al.* (2005) a permis de mettre en évidence l'interaction entre le domaine C1 du syndécan-4 et la dynamine II, une GTPase qui contrôle l'endocytose.

Le domaine C2 de tous les syndécans présente une séquence EFYA qui permet la fixation de protéines à domaines PDZ (*postsynaptic density-95, disc large protein, zonula occludens-1*). Ces protéines sont impliquées dans l'assemblage d'échafaudages moléculaires aboutissant au regroupement de récepteurs, à la liaison de récepteurs au cytosquelette ou encore à la formation de complexes de signalisation (Grootjans *et al.*, 1997 ; Bass & Humphries, 2002). Plusieurs protéines à domaines PDZ sont connues pour interagir avec les syndécans. Il s'agit de la synténine, la synectine, CASK/LIN-2 et la synbindine (Bernfield *et al.*, 1999 ; Bass & Humphries, 2002 ; Couchman, 2003 ; Wang & Heitman, 2005). Grootjans *et al.* (1997) ont été les premiers à caractériser l'interaction des syndécans avec la synténine.



Quant à CASK/LIN-2, c'est l'homologue de LIN-2 de *C. elegans* et un membre de la famille MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*). Il permettrait la distribution cellulaire des syndécans et servirait de lien entre les récepteurs et les protéines du cytosquelette (Cohen *et al.*, 1998 ; Hsueh *et al.*, 1998). Par ailleurs, des interactions entre la synectine et le syndécan-4 et entre la synbindine et le syndécan-2 ont également été décrites (Gao *et al.*, 2000 ; Ethell *et al.*, 2000). Bien que dépourvue de domaine PDZ proprement dit, la synbindine présente de nombreuses homologies avec les protéines à domaine PDZ.

Bien que conservé entre les espèces, le domaine V varie pour chaque syndécan, suggérant son implication dans les fonctions spécifiques de chacun. L'exemple le plus étudié est le domaine V du syndécan-4. En effet, ce domaine est à l'origine de la formation de plaques focales d'adhérence, de la régulation de l'activité du FGF et sert de domaine de liaison pour de nombreuses protéines comme le syndesmos ou l' $\alpha$ -actinine (Kramer & Yost, 2003 ; Bass & Humphries, 2002).

La structure des syndécans suggère qu'ils puissent partager des fonctions communes, mais également être impliqués dans des mécanismes différents. En effet, les interactions avec de nombreux partenaires cytosoliques communs ou spécifiques à un seul type de syndécans expliquent l'implication de ce protéoglycane dans diverses activités biologiques.

## b) Fonctions des syndécans

### - Protéines de signalisation associées aux syndécans

L'absence d'activité kinase intrinsèque n'exclut pas la participation des syndécans à l'activation de voies de signalisation. La fixation d'adaptateurs sur le domaine cytoplasmique permet de palier à ce manque comme cela a déjà été décrit pour les intégrines. Les protéines de la famille FERM sont de bons exemples car elles permettent de relier le domaine cytoplasmique des syndécans au cytosquelette. Granès *et al.* (2000 ; 2003) ont montré que l'eitrine se fixe au syndécan-2 par un mécanisme dépendant de Rho-A et se lie à l'actine par son extrémité C-terminale.

Les connexions avec le cytosquelette peuvent être plus indirectes. Les protéines à domaine PDZ jouent ce rôle. En effet, elles lient les protéines FERM ou la merline et la taline qui sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. La synténine permet de relier le syndécan-4 aux fibres de stress et aux plaques focales et co-localise avec le syndécan-1, la cadhérine E, les  $\alpha$ - et  $\beta$ -caténines au niveau des jonctions cellulaires (Zimmerman *et al.*, 2001 ; Yoneda & Couchman, 2003). Le syndécan-2 co-localise avec CASK au niveau des synapses neuronales chez le rat, ce qui suggère l'implication du protéoglycane dans la

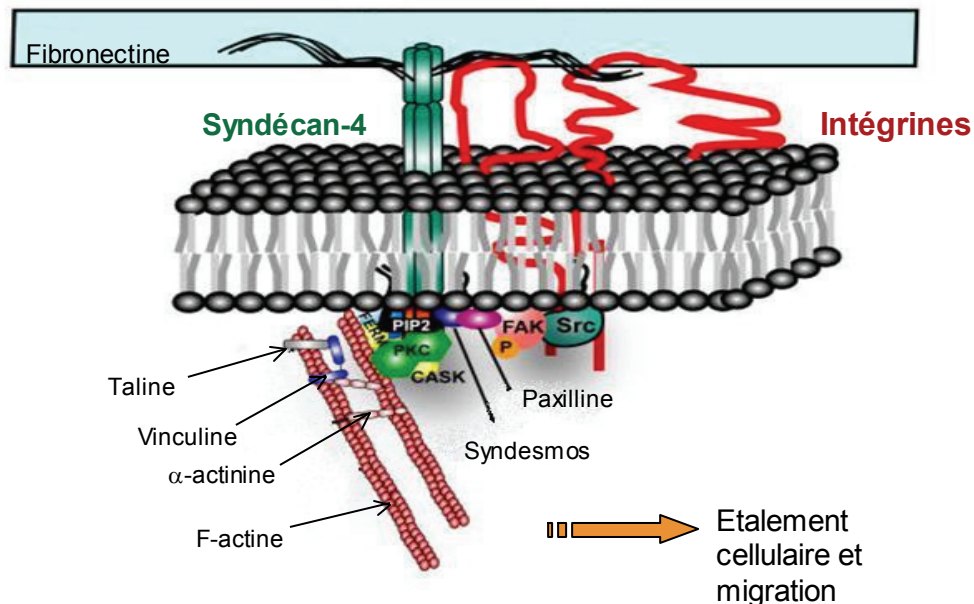
signalisation des jonctions synaptiques (Hsueh *et al.*, 1998). Une cascade syndécan/CASK/protéine 4.1 et actine peut se former et réguler l'étalement et la migration cellulaires (Cohen *et al.*, 1998). De plus, l'interaction de syndécan/CASK permettrait la distribution des syndécans au niveau basolatéral de la cellule.

Par ailleurs, le syndécan-4 fixe une protéine myristoylée, le syndesmos qui sert d'adaptateur pour lier une autre protéine intermédiaire du cytosquelette, la paxilline. Ces protéines co-localisent dans les plaques focales d'adhérence et activent spécifiquement les intégrines  $\alpha 5$ , ce qui augmente la capacité à des cellules à adhérer fermement (Baciu *et al.*, 2000 ; Denhez *et al.*, 2002).

De nombreux travaux ont souligné la participation des petites protéines GTPases de la famille Rho dans le contrôle de la migration ou l'adhérence cellulaire qui sont deux phénomènes liés au réarrangement du cytosquelette. Les intégrines et le syndécan-4 agissent de concert dans la formation des plaques focales et des fibres de stress par un mécanisme Rho-dépendant. Toutefois, l'implication du syndécan-4 sur la régulation de Rho n'est pas claire (Saoncella *et al.*, 1999 ; Bass & Humphries, 2002). Les ERM peuvent induire la dissociation de l'inhibiteur de RhoA, le Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor, permettant ainsi à la GTPase d'être active (Mammoto *et al.*, 2000). L'activation de Rho par les syndécans a été confirmée par les travaux de Wilcox-Adelman *et al.* (2002). La liaison du syndécan-4 à la fibronectine induit la phosphorylation de la kinase FAK sur le résidu Tyr<sup>397</sup>. Dans ce contexte, c'est la multimérisation de syndécan-4 qui permet l'activation de Rho qui a son tour inhibe l'activité d'une tyrosine phosphatase responsable de l'inactivation de FAK. De plus, la participation de cdc42 a été évoquée notamment dans la formation de filopodes par le syndécan-2 (Granès *et al.*, 2003). Récemment, il a été montré que la migration de cellules endothéliales induite par le syndécan-4 passe également par l'activation de Rac-1 (Tkachenko *et al.*, 2005).

Le meilleur exemple de l'implication des cores protéiques dans la signalisation est la participation du syndécan-4 à la formation de la plaque focale d'adhérence (figure 12). La surexpression du syndécan-4 dans des cellules CHO conduit à l'augmentation du nombre et de la taille des plaques focales d'adhérence, révélant l'importance du protéoglycane dans cette activité (Longley *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'effet du protéoglycane peut être remplacé par l'utilisation d'esters de phorbols, connu pour activer la PKC $\alpha$ . La présence de la PKC $\alpha$  est essentielle à la formation de la plaque et il semble que son recrutement soit dépendant du syndécan-4. La fixation des syndécans-4 à la fibronectine va induire son oligomérisation. Les domaines V se rapprochent et un résidu de lysine contenu dans la séquence KKPIYKK de ce

domaine va fixer le PIP<sub>2</sub>. Ces interactions permettent de stabiliser le complexe, d'augmenter l'oligomérisation des syndécans et surtout de recruter et d'activer la PKC $\alpha$ . Les domaines V des syndécans-1 et -2 sont dépourvus de cette activité. Il est à noter que l'activation de la PKC $\alpha$  se fait en l'absence de libération de calcium qui serait un inhibiteur de la plaque focale (Oh *et al.*, 1997 ; 1998 ; Beauvais & Rappraeger, 2004).



**Figure 12:** Participation du syndécan-4 à la formation des plaques focales d'adhérence (d'après Beauvais & Rappraeger, 2004).

Le nombre de syndécans et de molécules de PIP<sub>2</sub> nécessaire reste encore à déterminer. Un octamère de syndécans est plus efficace qu'un tétramère mais un dimère semble insuffisant pour induire l'activation de la PKC (Oh *et al.*, 1997 ; 1998 ; Horowitz *et al.*, 1999). Toutefois, certains auteurs imaginent un modèle où les domaines cytoplasmiques s'enchevêtrent l'un avec l'autre pour recruter la PKC (Shin *et al.*, 2001). De plus, des travaux utilisant des protéines de fusion ou des peptides synthétiques suggèrent que la fixation de la PKC $\alpha$  puisse se faire directement à condition que le syndécan soit au moins dimérisé (Lim *et al.*, 2003). Cette liaison directe se ferait grâce au domaine catalytique de l'enzyme alors que le PIP<sub>2</sub> se fixe au domaine régulateur de la PKC $\alpha$ . L'association entre le syndécan-4 et la PKC $\alpha$  classe le protéoglycane dans la famille des récepteurs dépourvus d'activité intrinsèque mais associés à des kinases.

La phosphorylation est un signal crucial pour la propagation des signaux intracellulaires. Le domaine cytoplasmique des syndécans présente des résidus d'acides

aminés phosphorylables. Par analogie avec les systèmes décrits pour les récepteurs, la phosphorylation du syndécan permettrait le recrutement de protéine à domaine SH2 et la formation de complexes de signalisation. Plusieurs études ont également rapporté la phosphorylation des syndécans notamment par des PKC ou par des récepteurs associés aux syndécans (Zimmermann & David, 1999 ; Chaudhuri *et al.*, 2005). Ainsi, la capacité d'oligomérisation du syndécan-4 dépend de son statut de phosphorylation. La phosphorylation de la Ser<sup>183</sup> de son domaine cytoplasmique réduit fortement la fixation de PIP<sub>2</sub>. Cette phosphorylation est assurée par la PKC $\delta$ , soulignant la capacité d'une PKC à réguler l'activité d'une autre alors que la phosphatase reste indéterminée (Horowitz *et al.*, 1998 ; 1999 ; Murakami *et al.*, 2002 ; Oh *et al.*, 1998). Une étude récente par RMN a montré que la phosphorylation de la Ser<sup>183</sup> conduit à un changement conformationnel réduisant l'affinité de PIP<sub>2</sub> pour le syndécan et par conséquent l'activation de la PKC $\alpha$  (Koo *et al.*, 2006). Même si la phosphorylation a lieu dans le domaine C1, les répercussions sur l'ensemble du domaine intracellulaire sont importantes et gênent les interactions. Dans les cellules endothéliales, l'activation de la PKC $\delta$  *in vitro* par la lysophosphatidylcholine conduit à la phosphorylation du syndécan-4, augmentant son affinité pour l' $\alpha$ -actinine. L'inhibition de la PKC $\alpha$  qui en découle conduit à la dissociation des plaques focales et à l'inhibition de la migration (Chaudhuri *et al.*, 2005).

#### - Régulation des mécanismes adhérence/migration

Les chaînes HS interagissent avec de nombreux constituants de la matrice comme la fibronectine, la laminine, la vitronectine et le collagène fibrillaire, mais aussi avec des molécules d'adhérence comme PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule*), N-CAM (Bernfield, 1999 ; Delehedde, 2001). Toutefois, l'implication des HSPG membranaires dans les phénomènes d'adhérence est plus complexe. Le core protéique a une réelle importance car il interagit avec de nombreuses protéines de signalisation ou du cytosquelette, reliant ainsi la matrice extracellulaire à l'organisation structurale de la cellule.

Différentes parties du core protéique sont impliquées dans des phénomènes d'adhérence. La partie cytoplasmique du syndécan-1 est impliquée dans l'étalement cellulaire (*spreading*). Des cellules dépourvues de ce protéoglycane n'adhèrent pas fermement à la fibronectine alors que sa surexpression conduit à l'étalement des cellules de Schwann (Carey *et al.*, 1996 ; 1997). Ce spreading semble dépendant du domaine cytoplasmique bien que certains auteurs l'attribuent à l'ectodomaine. Dans des cellules lymphoïdes de type B, les ectodomains des syndécans-1 et -4 pourraient directement fixer des molécules d'adhérence

(Stanley *et al.*, 1995 ; Couchman, 2003). Le syndécan-1 participe en coopération avec les intégrines  $\alpha V\beta 3$  à l'étalement cellulaire (Beauvais & Rapraeger, 2004). En revanche, les cellules lymphoïdes adhèrent à la thrombospondine ou à la fibronectine sous l'effet de l'expression du syndécan-1 par un mécanisme indépendant des intégrines mais grâce à la formation d'oligomères de syndécans *via* leur domaine extracellulaire ou transmembranaire (Lebakken & Rapraeger, 1996 ; Lebakken *et al.*, 2000).

L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre le syndécan-1 induit la perte de polarité de cellules épithéliales de glandes mammaires associée à une diminution de l'expression de surface de la cadhérine E et à la désorganisation des filaments d'actine F. L'absence de syndécan-1 augmente le pouvoir invasif des cellules dans des gels de collagène, confirmant le rôle du protéoglycane dans les phénomènes d'adhérence (Kato *et al.*, 1995). La co-localisation du syndécan-1, de la cadhérine E et des  $\alpha$ - et  $\beta$ -caténines grâce à la synténine qui sert d'intermédiaire a confirmé le rôle des syndécans dans la régulation des jonctions présentes entre les cellules épithéliales (Couchman & Woods, 2001 ; Zimmerman *et al.*, 2001). Le syndécan-2 induit la formation de filopodes grâce à ses chaînes HS. Toutefois, le domaine cytoplasmique est également impliqué car il lie l'eitrine qui relie les syndécans aux protéines du cytosquelette (Granès *et al.*, 1999 ; 2000). Il induit également la formation d'épines dendritiques par les neurones de l'hippocampe chez le rat. Cet effet est dépendant de la multimérisation et de la phosphorylation du syndécan par le récepteur tyrosine kinase EphB2 (Ethell *et al.*, 2001).

Les plaques focales d'adhérence sont des zones spécialisées de la membrane où il se crée des interactions cellule-matrice. Elles sont situées à l'extrémité des fibres de stress et constituent des centres de signalisation où la matrice extracellulaire se retrouve physiquement connectée au cytosquelette par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. L'adhérence forte des cellules à la fibronectine nécessite d'une part l'interaction des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  avec le domaine RGD ou des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  avec le domaine CS-1 de la fibronectine et d'autre part l'interaction des HSPG membranaires avec le domaine HepII (*heparin binding domain*) contenu dans la partie C-terminale de la fibronectine. L'adhérence des fibroblastes uniquement par leurs intégrines est insuffisante à la formation de plaques focales, révélant l'importance de la fixation sur le domaine HepII. Bien que les chaînes HS soient directement responsables de la liaison au domaine HepII, le core protéique est nécessaire à la formation de la fibre de stress et de la plaque focale (Echtermeyer *et al.*, 1999). En effet, le syndécan-4 est décrit pour co-localiser avec les intégrines dans les plaques focales d'un grand nombre de cellules adhérentes sur des substrats variés (Woods *et al.*, 1994 ; Yoneda & Couchman, 2003).

La surexpression du syndécan-4 dans des cellules CHO induit l'augmentation du nombre et de la taille des plaques focales d'adhérence, ce qui conduit à l'apparition d'un phénotype fibroblaste (Longley *et al.*, 1999). Le domaine V permet la formation du complexe ternaire composé de syndécan-4 sous forme multimérisée, de PIP2 et de la PKC $\alpha$  qui participe à la formation de la plaque focale (Oh *et al.*, 1997 ; 1998). L'implication du syndécan-4 dans la formation de fibres de stress et de plaques focales a également été mise en évidence grâce à sa capacité à fixer une autre molécule d'adhérence, ADAM-12, une disintégrine et métalloprotéinase dans les cellules mésenchymales (Iba *et al.*, 2000).

L'interaction des protéoglycanes avec les molécules d'adhérence se répercute au niveau intracellulaire par des interactions entre la partie cytoplasmique du protéoglycane et les molécules du cytosquelette. Ainsi, lors du spreading, le syndécan-1 co-localise transitoirement avec les filaments d'actine par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique. Cette interaction disparaît une fois l'étalement achevé (Carey *et al.*, 1997). De plus, le syndécan-1 en association avec l'actine F et la fascine régule l'adhérence sur la thrombospondine. Ce phénomène est impliqué dans les contacts cellule-cellule entre les cellules épithéliales et est dépendant de la phosphorylation de la fascine via l'activation de Cdc42 et de Rac (Adams *et al.*, 2001). Le syndécan-3 induit l'adhérence et l'étalement cellulaire des cellules de Schwann sur le domaine N-terminal de la chaîne A4 du collagène de type V, un nouveau site de fixation des HS. Cette fixation conduit à l'assemblage de molécules d'actine, à la phosphorylation de tyrosines et l'activation de ERK1/2 (Erdman *et al.*, 2002). Ce protéoglycane interagit également avec la tubuline, ce qui implique les syndécans dans la régulation des microtubules (Kinnunen *et al.*, 1998a ; 1998b). De plus, le domaine V du syndécan-4 peut se fixer directement à l' $\alpha$ -actinine, ce qui confirme une fois de plus la relation entre les syndécans et le réarrangement du cytosquelette (Couchman, 2003).

La variabilité des mécanismes décrits pour chacune des isoformes n'exclut pas la coopération des syndécans dans l'organisation du cytosquelette. Dans des cellules de cancer du poumon, le taux de syndécan-2 module la réponse cellulaire d'un anticorps anti-syndécan-4 activateur. Ainsi, un faible taux de syndécan-2 conduit à la formation d'un cortex d'actine alors qu'un taux plus important est à l'origine de la formation de fibres de stress. Il y aurait un « by-pass » entre les deux isoformes, orientant les réponses cellulaires (Kusano *et al.*, 2004).

Les activités des syndécans sont dépendantes des types cellulaires et des conditions physiologiques. Alors que le syndécan-2 ne participe pas à la formation de la plaque d'adhérence ou de la fibre de stress dans les fibroblastes, il induit la formation de la fibre de

stress dans les cellules cancéreuses P29 en coopération avec les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  (Kusano *et al.*, 2000 ; Munesue *et al.*, 2002). L'expression du syndécan-1 est associée au maintien du phénotype épithélial et à l'inhibition de la migration lors d'expériences de transformations malignes. L'inhibition de l'expression de ce protéoglycane induit la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses associée à une augmentation de la migration cellulaire. Ces données expliquent pourquoi la diminution de syndécan-1 dans les cancers est corrélée à l'agressivité des tumeurs. En revanche, la surexpression du syndécan-1 dans certains cancers (sein, pancréas) conduit à la perte du phénotype adhérent et de l'inhibition de contact, démontrant un rôle des syndécans dans la tumorigénèse et le caractère invasif des cellules (Beauvais & Rapraegher, 2004). Ces données suggèrent que le rôle des syndécans dans l'adhérence est modulé en fonction du type de cancer et que le mode de régulation est très complexe. Chaque contexte est différent en fonction du type de cancer et des ligands potentiels des syndécans notamment au niveau des facteurs mitogènes. Il en est de même dans la régulation de la réaction immunitaire et dans certaines pathologies comme les maladies vasculaires, l'obésité et l'infection par les pathogènes. Ces données démontrent que les syndécans sont des éléments régulateurs de poids dans la balance adhérence/migration des cellules.

#### - Fonction de co-récepteur

La participation des HSPG comme co-récepteur de signalisation a été mise en évidence par les travaux de Volk *et al.* (1999). L'utilisation de constructions chimériques a démontré que le domaine cytoplasmique du syndécan-4 est essentiel à l'activité angiogénique du FGF-2 dans les cellules endothéliales. Depuis, de nombreux travaux ont démontré l'importance du core protéique des syndécans dans la signalisation des médiateurs extracellulaires.

Le syndécan-1 est considéré comme un récepteur fonctionnel du HGF (*hepatocyte growth factor*) car il favorise sa signalisation depuis le récepteur tyrosine kinase c-Met dans plusieurs cellules de myélomes. Le complexe ternaire formé permet d'augmenter l'activation des voies PI3-K et p44/p42 MAPK impliquées respectivement dans la survie et la prolifération cellulaires (Derksen *et al.*, 2002). Ce syndécan a aussi été décrit dans l'activité chimioattractante des monocytes du sang induite par l'ostéoprotégérine, une protéine impliquée dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'ectodomaine du syndécan-1 inhibe la phosphorylation de PKC et de AKT induite par le chimioattractant (Mosheimer *et al.*, 2005).

Récemment, Ogawa *et al.* (2007) ont montré que le fragment  $\gamma 2sa$  de la laminine 5 grâce à son interaction avec le récepteur à l'EGF (*epidermal growth factor*) régule la balance adhérence/migration dans les cellules épithéliales. Ce récepteur induit la phosphorylation des intégrines  $\beta 4$  contenues dans les hémidesmosomes, ce qui a pour conséquence d'assurer le désassemblage de ces jonctions cellulaires et de promouvoir la migration. En se fixant sur le syndécan-1, le fragment  $\gamma 2sa$  inhibe cette phosphorylation, stabilise les hémidesmosomes et induit l'adhérence. Ces données suggèrent que le syndécan-1 permet de réguler les signaux induits par le récepteur à l'EGF par une voie de signalisation qui reste à déterminer. Ces travaux sont les premiers à démontrer le lien entre le syndécan-1 et les intégrines  $\beta 4$ .

Bien que le TGF- $\beta$  puisse se fixer sur les chaînes HS de tous les syndécans, seul le syndécan-2 peut former une interaction protéine-protéine avec cette cytokine. L'inactivation du domaine cytoplasmique de ce protéoglycane inhibe les réponses du TGF- $\beta$ . En fixant la synéctine à la place du bétaglycan, récepteur de type III du TGF- $\beta$ , le syndécan-2 régulerait l'expression membranaire des récepteurs de signalisation (Chen *et al.*, 2004 ; Tkachenko *et al.*, 2005). Le domaine cytoplasmique du syndécan-2 participe également au contrôle de la différenciation et de la prolifération des ostéoblastes induites par le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*). Ces auteurs ont par la suite montré que ce domaine induit l'activation de la voie JNK/Bax responsable de l'apoptose des cellules MG63 d'ostéosarcomes (Modrowski *et al.*, 2000 ; 2005)

L'utilisation de syndécan-3 soluble ou d'héparine libre bloque la croissance neuritique induite par HB-GAM (*heparin-binding growth-associated molecule*) qui est impliquée dans la croissance des neurites et l'extension des axones. Des cellules de neuroblastomes exprimant le syndécan-3 répondent à l'HB-GAM par un mécanisme dépendant de la phosphorylation de la tyrosine kinase Src. Le domaine cytoplasmique du syndécan-3 interagit par l'intermédiaire d'une protéine inconnue de 30 kDa avec les kinases Src et Fyn, avec la cortactine et la  $\beta$ -tubuline (Kinnunen *et al.*, 1998a ; 1998b ; Zimmermann & David, 1999 ; Beauvais & Rapraeger, 2004).

Le rôle du syndécan-4 comme co-récepteur a été largement étudié. Ces travaux ont révélé son implication dans le chimiotactisme des neutrophiles, lymphocytes et monocytes du sang en réponse à l'anti-thrombine III (Kaneider *et al.*, 2002 ; Dunzendorfer *et al.*, 2001). Le SDF-1 est une chimiokine qui se fixe sur un complexe récepteur composé du CXCR4 et du syndécan-4. Cette interaction conduit à la migration, la prolifération et la différenciation leucocytaires. Le complexe CXCR4/syndécan-4 existe en l'absence de ligand. La fixation du ligand induit la phosphorylation du syndécan-4 par le CXCR4 et l'activation des voies



p42/p44 MAPK et JNK responsables des effets biologiques (Hamon *et al.*, 2004 ; Charnaux *et al.*, 2005). Le facteur de transcription ATF-2 (*activating transcription factor-2*) est également régulé par le syndécan-4. Les fibroblastes issus de Souris déficientes en syndécan-4 présentent une suractivation des voies Rac-1, p38 et JNK aboutissant à une activité ATF-2 élevée. La réexpression du syndécan dans ces cellules permet de diminuer l'activité transcriptionnelle de ATF-2 (Saoncella *et al.*, 2004).

### c) Régulation de l'expression des syndécans

Chaque syndécan présente une expression spatiale et temporelle dépendante des conditions physiologiques et physiopathologiques. Au vu de l'abondance de mécanismes auxquels ils participent, l'expression des syndécans est finement régulée. L'expression des syndécans à la surface cellulaire est dépendante de la régulation génique, de phénomènes d'endocytose et du clivage protéolytique de l'ectodomaine. De nombreux facteurs se fixant sur les protéoglycanes régulent leur propre activité en modulant l'expression des protéoglycanes. Ainsi, l'expression du syndécan-4 est augmentée en réponse au FGF-2 (Song *et al.*, 2007). Le TNF- $\alpha$  augmente l'expression du syndécan-2 et diminue celle du syndécan-1. L'expression du syndécan-4 est augmentée par des stress mécaniques lors de l'athérosclérose ou de réparation tissulaire. Le syndécan-3 est constant sauf lors du développement (Tkachenko *et al.*, 2005). L'existence d'une régulation post-transcriptionnelle est suggérée car l'expression du syndécan-1 peut augmenter de 3 à 10 fois sans modification du taux d'ARNm. Au contraire, l'expression à la surface est faible alors que le taux d'ARNm reste constant ou augmente (Sanderson *et al.*, 1992 . Asundi *et al.*, 1997 ; Levy *et al.*, 1996) .

L'expression membranaire des syndécans est régulée également par des phénomènes d'endocytose. En effet, la liaison d'HBP peut induire l'internalisation des ligands comme cela a été décrit pour la protéine lipase (Fuki *et al.*, 1997). Le recyclage des syndécans à la membrane est contrôlé par l'interaction entre le syndécan, la synténine et le PIP2 ainsi qu'Arf-6 (*ADP-ribosylation factor-6*), un constituant des endosomes (Zimmermann *et al.*, 2005).

Le clivage protéolytique des syndécans est un processus hautement régulé qui libère l'ectodomaine dans le milieu extracellulaire. Ce phénomène appelé « shedding » se produit à proximité de la membrane plasmique grâce à l'intervention de protéases notamment les MMPs (Bernfield *et al.*, 1999 ; Fitzgerald *et al.*, 2000 ; Endo *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2005a). Ce phénomène est constitutif mais est accéléré dans les cas de cancer et en réponse à des stimuli inflammatoires. Il est activé par la thrombine (Subramanian *et al.*, 1997), l'insuline

(Reizes *et al.*, 2006), de nombreuses cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  ou encore les chimiokines comme le SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) (Day *et al.*, 2006 ; Charnaux *et al.*, 2005 ; Couchman *et al.*, 2003) et les facteurs de croissance (EGF, FGF-2, VEGF) (Fears *et al.*, 2006). Les taux d'ectodomains de syndécan-1 et -4 sont fortement augmentés chez les patients souffrants de pathologies du derme et dans les cas de réparation tissulaire (Subramanian *et al.*, 1997 ; Alexopoulou *et al.*, 2006). Le fragment libéré devient un récepteur soluble capable de fixer les ligands comme son précurseur membranaire (Elenius *et al.* 1992 ; Kato *et al.*, 1998 ; Charnaux *et al.*, 2005). Selon les ligands, les formes solubles vont pouvoir agir comme des activateurs ou des inhibiteurs. L'addition d'ectodomains de syndécan-1 à des cultures de cellules de carcinomes mammaires réduit la progression tumorale. Ces résultats suggèrent que la séquestration de facteurs de croissance par la forme soluble empêche l'interaction de ces facteurs avec leurs récepteurs membranaires. D'autre part, cette fixation peut favoriser l'activité de ces facteurs notamment en inhibant des protéases comme la cathepsine G et l'élastase, protégeant ainsi les facteurs de la dégradation (Bernfield *et al.*, 1999 ; Gallagher & Lyon, 2000 ; Beauvais & Rapraeger, 2004). Ce clivage protéolytique est important dans de nombreux processus physiologiques comme pathologiques, mais les données sur sa régulation restent incomplètes.

### C. 2.2. Les glypicans

#### a) structure et expression

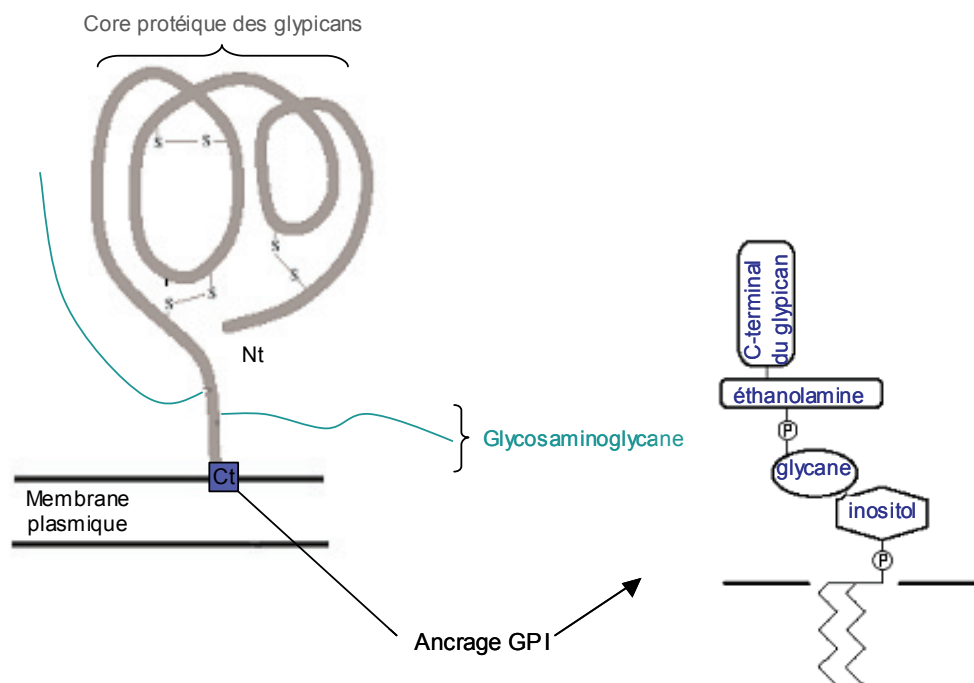
A la différence des syndécans, les glypicans ne possèdent ni domaine transmembranaire ni domaine cytoplasmique. Ils ont la particularité d'être insérés dans la membrane grâce à un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Figure 13).

Six isoformes (glypican-1 à -6) ont été décrites chez les mammifères et deux chez la drosophile. Les cores protéiques (60 à 70 kDa) sont constitués d'un peptide signal de sécrétion en position N-terminale et d'un domaine hydrophobe permettant la fixation de l'ancre GPI du côté C-terminal. Ce domaine est clivé par l'addition d'un groupement GPI préformé. Le degré de conservation entre les glypicans est faible, à l'exception de la présence de 14 résidus de cystéines situés dans la région centrale et à proximité du domaine N-terminal. La réduction de ces cystéines sous forme de ponts disulfures semble à l'origine de la structure globulaire retrouvée chez toutes les isoformes (Saunders *et al.*, 1997 ; Filmus & Song, 2000 ; Filmus & Selleck, 2001 ; Fransson *et al.*, 2004).

L'insertion des chaînes GAGs se fait à proximité de la membrane plasmique. Une région riche en résidus de serine et de glycine entourée par des acides aminés acides

(DDGSGSGSGD) sert à fixer 3 à 4 chaînes par glypicans. De tels motifs sont caractéristiques de l'attachement de chaînes HS. Toutefois, la présence de chaînes chondroïtanes sulfates a été décrite comme pour les syndécans (Bernfield *et al.*, 1999 ; Kramer & Yost, 2003). Le domaine N-terminal pourrait influencer le type de chaînes se liant sur les glypicans (Chen & Lander, 2001). Une population dépourvue de chaînes a même été décrite par Siebertz *et al.* (1999).

L'expression des glypicans est modulée en fonction du tissu et du stade cellulaire. En général, leur expression prédomine au moment du développement. Le glypican-1 est fortement présent dans le cerveau au cours du développement alors que son expression est plus ubiquitaire à l'âge adulte. Le glypican-2 est présent au niveau des cônes de croissance et des axones dans le cerveau lors du développement mais ne semble pas être exprimé à l'âge adulte. Les isoformes 3 à 6 ont une répartition large mais dont le taux diminue entre le stade embryonnaire et l'âge adulte. Ces données révèlent l'importance de ces molécules dans les phénomènes de morphogenèse (Filmus & Selleck, 2001 ; Fransson *et al.*, 2004). Des variations d'expressions ont été rapportées dans des cellules cancéreuses. Par exemple, l'expression du glypican-3 augmente dans des cellules de carcinomes de foie alors qu'il devient absent lors de cancer de sein (Sung *et al.*, 2003 ; Xiang *et al.*, 2001 ; Kleeff *et al.*, 1998).



**Figure 13 :** Représentation schématique des glypicans (d'après De Cat & Guido, 2001).

Grâce à leur ancre GPI, les glypicans sont localisés au niveau des rafts ou des cavéoles. Les rafts sont riches en cholestérol, sphingolipides, en protéines à ancrage GPI et en tyrosine kinases de la famille Src comme Fyn et Lck et servent de plateformes spécialisées dans la transduction du signal. La présence des glypicans au niveau des cavéoles suggère leur implication dans des phénomènes d'endocytose. Ainsi, le groupement GPI permet aux glypicans d'être impliqués dans des voies de signalisation et d'endocytose spécifiques, conduisant à la régulation des activités de facteurs de croissance et de cytokines (Fransson *et al.*, 1998 ; Ding *et al.*, 2002).

Comme les syndécans, les glypicans sont sensibles au shedding. Un clivage des groupements phosphatidylinositols par des phospholipases spécifiques, les PI-PLC et D, permet la libération des glypicans. L'action de la PI-PLC laisse le motif phosphoinositol sur le glypican, ce qui génère un signal d'endocytose, conduisant à l'internalisation et la dégradation du récepteur (Ishihara *et al.*, 1987 ; Brunner *et al.*, 1994). Un clivage protéolytique a également été mis en évidence pour les glypicans-1, -3 et -4. Cependant, ce clivage a lieu dans la partie N-terminale de la protéine mais le domaine clivé reste attaché à la partie C-terminale grâce aux ponts disulfures. La protéase et la signification biologique de ce clivage demeurent inconnues à ce jour (Watanabe *et al.*, 1995 ; Liang *et al.*, 1997).

## b) Fonctions des glypicans

### - Fixation de médiateurs

La structure des chaînes HS est dépendante du type cellulaire et non du core protéique, ce qui suggère que les glypicans peuvent fixer les mêmes ligands que les syndécans (Tumova *et al.*, 2000 ; Gallagher, 2001). L'absence de domaine cytoplasmique soulève le problème de la transduction du signal. Toutefois, des études ont démontré que le glypican-1 sensibilise les cellules endothéliales du cerveau à l'effet mitogène du FGF alors que la surexpression de syndécan-1 n'a pas d'effet (Steinfeld *et al.*, 1996 ; Qiao *et al.*, 2003). Il sert également de chaperone extracellulaire pour le VEGF et est responsable de l'activité du facteur de croissance (Gengrinovitch *et al.*, 1999). Le glypican-3 intervient également dans la signalisation d'autres facteurs de croissance comme le FGF-7 et les BMP-2 et -7 (*bone morphogenetic protein*) lors de la morphogenèse rénale (Grisaru *et al.*, 2001, Hartwig *et al.*, 2005). Les activités des glypicans semblent dépendantes des kinases présentes dans les rafts qui viennent compléter l'absence de domaine cytoplasmique (Ilangumaran *et al.*, 2000 ; Simons & Tomre, 2000).

Les patients atteints du syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS) présentent des anomalies au niveau du squelette et des viscères et une surcroissance des organes. Il a été démontré que la mutation du glypican-3 était responsable de cette maladie (Pilia *et al.*, 1996 ; Pellegrini *et al.*, 1998). Ce syndrome présente des similitudes avec celui de Beckwith-Wiedeman (BWS) où l'activité de l'IGF-II (*Insulin Growth Factor-II*) a été mise en cause. L'IGF-II se fixe sur son récepteur de signalisation (type I) mais aussi sur un récepteur négatif qui induit l'endocytose et la dégradation du facteur de croissance. Les souris déficientes en glypican-3 possèdent le même retard de développement que celles déficientes dans l'expression du récepteur négatif de l'IGF-2 (IGF2R), suggérant que le glypican-3 inhibe les réponses induites par l'IGF-II. Toutefois, aucune liaison directe entre l'IGF-II et le glypican n'a pu être établie. Le taux de l'IGF-II n'est par ailleurs pas modifié chez les animaux déficients en glypican-3. Ces données suggèrent que le glypican-3 régule négativement l'activité de l'IGF-II par un mécanisme différent de celui décrit pour l'IGF2R (Filmus & Selleck, 2001 ; Song & Filmus, 2002). Néanmoins, l'inactivation des glypicans provoque un phénotype comparable à celui observé lors de l'inhibition de l'expression des chaînes HS, suggérant que la fonction principale des glypicans est de porter des chaînes HS plutôt que d'être des molécules de signalisation à part entière.

L'expression variable des glypicans dans les cellules cancéreuses permet de moduler l'activité des facteurs mitogènes. La technique d'ARN interférence a montré que l'inhibition du glypican-3 conduit à la diminution des réponses mitogènes induites par les facteurs de croissance. L'inactivation du glypican-1 dans des cellules cancéreuses du pancréas inhibe l'activité mitogène du FGF-2 et de l'HB-EGF (*heparin-binding-EGF*) (Kleeff *et al.*, 1998 ; 1999 ; Su *et al.*, 2006). De manière générale, la transformation néoplasique induit l'expression du glypican-3 dans des cellules dépourvues de ce protéoglycane mais riche en glypican-1 (Filmus, 2001). Cette expression du glypican-3 fait de lui un potentiel marqueur tumoral et cible thérapeutique notamment dans les cancers du foie et du colon où son expression est nulle chez les sujets sains adultes (Hsu *et al.*, 1997 ; Capurro *et al.*, 2005). En revanche, certaines cellules n'expriment plus le glypican-3 une fois qu'elles sont devenues cancéreuses, ce qui a pour conséquence de diminuer la réponse des facteurs de croissance et la progression tumorale (Filmus, 2001). Par exemple, le glypican-3 des cellules d'ovaires devient indétectable dans les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire (Lin *et al.*, 1999).

#### - *Recyclage des glypicans et endocytose des polyamines*

Les ancres GPI auraient pour fonction majeure de diriger les protéines vers une voie de recyclage endosomale connectant des vésicules clathrine-indépendantes vers le *trans* Golgi

(Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001 ; Nichols, 2002). Le recyclage des glypicans conduit à l'acylation du core protéique, inhibant l'action de la PI-PLC. Des expériences de radiomarquages ont également montré que les chaînes HS sont dégradées dans les endosomes et que les glypicans sont recyclés à la membrane après resynthèse de nouvelles chaînes HS. Ce phénomène est intéressant car il permettrait de rapidement former des motifs différents de ceux initialement présents et ainsi réguler l'activité des ligands (Fransson *et al.*, 1995 ; Fransson *et al.*, 1998). La dégradation des chaînes HS se fait de façon enzymatique grâce à l'action d'héparanases et résulte en l'accumulation de glypicans avec des chaînes tronquées. Les études sur le glypican-1 ont montré que les chaînes HS subissent l'action d'endohéparanases à partir de l'extrémité réductrice, conduisant à la libération d'oligosaccharides. La dégradation se poursuit par l'action d'un clivage déaminatif à l'extrémité non-réductrice. En effet, le core protéique est S-nitrosylé sur les résidus de cystéines à partir du NO produit de l'arginine. La présence du couple redox  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  est essentielle à la fixation du NO. Les résidus S-nitrosylés vont relibérer le NO à proximité des chaînes HS, notamment en présence d'acide ascorbique. Le NO va dès lors induire le clivage déaminatif de l'extrémité non réductrice des chaînes au niveau de glucosamine libre. Ces données révèlent que l'apparition de ces résidus  $\text{GlcNH}_2$  constitue un vrai signal régulateur de la chaîne HS aussi bien dans la fixation spécifique de certains ligands que dans le turnover du protéoglycane (Ding *et al.*, 2001a ; 2001b ; 2002).

Ce recyclage va permettre de réguler la fixation des ligands, notamment les polyamines (putrescine, spermine et spermidine) (Belting *et al.*, 2002). Ces constituants naturels de toutes les cellules sont nécessaires à la survie et à la croissance cellulaires par des mécanismes jouant sur l'augmentation de la transcription et l'export d'ARNm (Cohen *et al.*, 1998). Une diminution du taux intracellulaire de polyamines déclenche un signal d'endocytose des glypicans dans le but de permettre l'entrée des polyamines fixées sur les chaînes HS. On peut noter que dans ce cas, les nouvelles chaînes HS synthétisées présentent plus d'affinité pour les polyamines et contiennent plus de résidus  $\text{GlcNH}_2$  favorisant la libération de ces composés après l'endocytose des glypicans (Ding *et al.*, 2001a ; 2001b). Par ailleurs, les cores protéiques des glypicans possèdent des signaux de localisations nucléaires, notamment la séquence permettant l'attachement des GAGs. Ils ont d'ailleurs été détectés dans le noyau de cellules neuronales et gliales (Liang *et al.*, 1997), suggérant leur participation dans le ciblage nucléaire des polyamines.

### C. 2.3. Le CD44

#### a) Structure et expression

Le CD44 est le principal récepteur de l'acide hyaluronique, un GAG linéaire non sulfaté impliqué dans l'hydratation et l'intégrité structurale de la matrice extracellulaire. Le CD44 est une protéine transmembranaire de type I encodé par un gène formé de 19 exons. Sa distribution est ubiquitaire. Il est exprimé à la surface des leucocytes, des fibroblastes, des cellules mésenchymateuses et épithéliales, des kératinocytes ainsi que sur certaines cellules endothéliales. L'expression du CD44 est variable en fonction des conditions physiologiques notamment dans les cas de cancer et d'activation des leucocytes où il est fortement augmenté (Jackson *et al.*, 1997 ; Forster-Horvath *et al.*, 2001).

Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques comme la domiciliation des leucocytes, l'hématopoïèse, la migration cellulaire et la progression tumorale (Screaton *et al.*, 1992 ; Greenfield *et al.*, 1999 ; Bajorath *et al.*, 2000). Cette diversité de fonction est liée à l'hétérogénéité structurale du CD44 résultante de l'épissage alternatif de 9 des exons (Figure 14). Une quinzaine d'isoformes ont été décrites. Cet épissage impose une grande variabilité structurale de l'ectodomaine à proximité de la membrane plasmique. En revanche, l'extrémité N-terminale de l'ectodomaine, les domaines transmembranaires et cytoplasmiques sont conservés (Isacke & Yarwood, 2002).

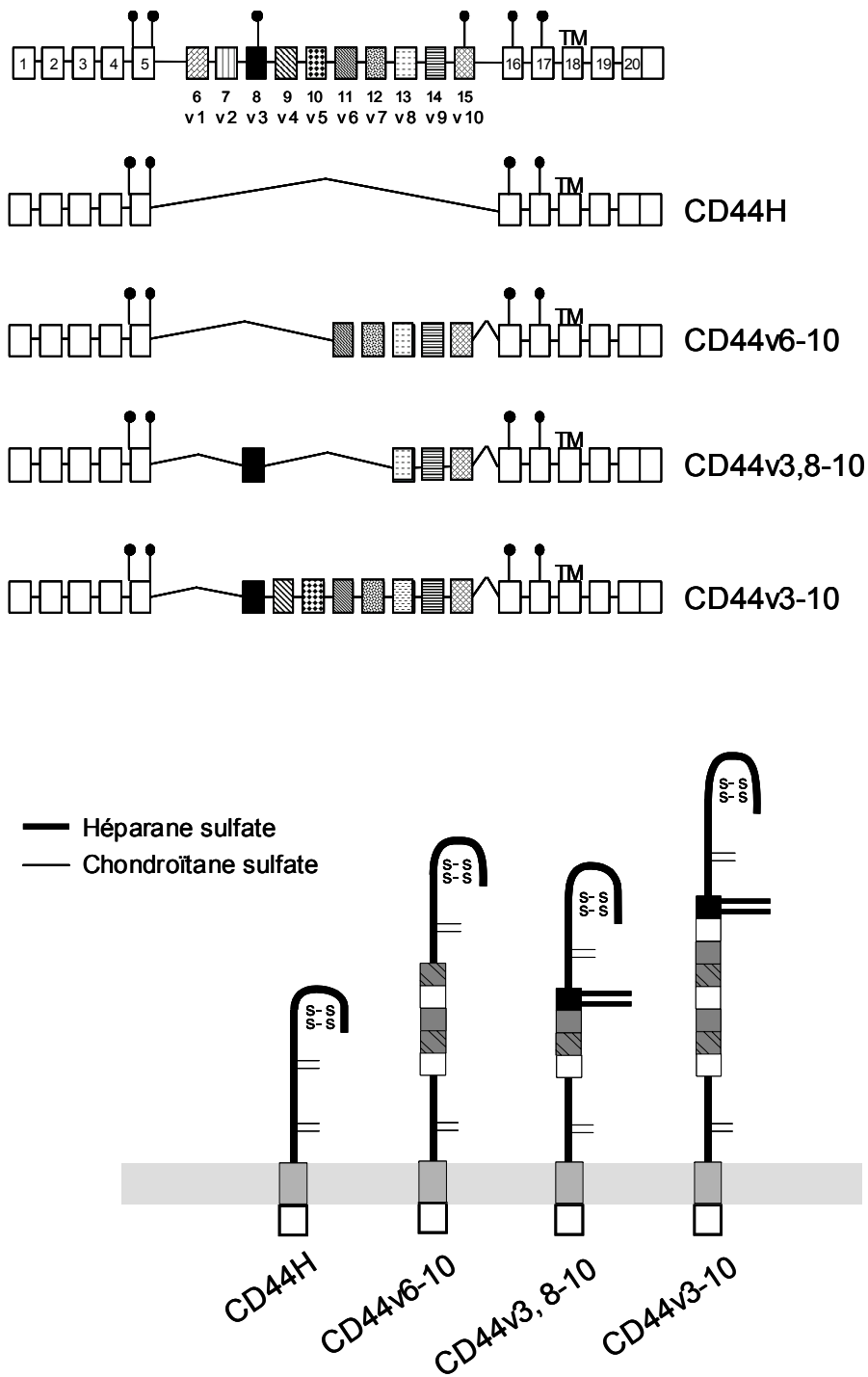
L'ectodomaine subit des modifications post-traductionnelles comme la N- et O-glycosylation et l'insertion de chaînes GAGs, contribuant à la diversité structurale (Screaton *et al.*, 1992 ; Bourguignon *et al.*, 1998 ; Isacke & Yarwood, 2002). Les isoformes contenant l'exon v3 (CD44V3-10 ; CD44v3, 8-10) ont la particularité de porter une chaîne HS grâce à la séquence Ser-Gly-Ser-Gly qu'ils contiennent. Cette constatation explique la capacité de ces protéoglycanes à fixer des HBPs telles que le FGF, HB-EGF et l'HGF/SF (Bennett *et al.*, 1995 ; Jackson *et al.*, 1995 ; van der Voort *et al.*, 1999 ; Wielanga *et al.*, 2000).

Comme pour les syndécans, le domaine cytoplasmique implique le CD44 dans de nombreuses fonctions biologiques. En effet, il fixe les protéines de la famille ERM et possède deux sites de phosphorylation permettant des interactions avec le cytosquelette et l'activation de voies de signalisation (Isacke & Yarwood, 2002 ; Kramer & Yost, 2003).

#### b) Fonctions

##### - Régulation des mécanismes d'adhérence/migration

A la différence des syndécans, l'implication du CD44 dans des phénomènes d'adhérence a été moins étudiée. Néanmoins, il est clairement établi que le CD44 sert de lien



**Figure 14** : Représentations schématiques des ARNm (A) et des protéines (B) des isoformes majeures du CD44 (Jackson *et al.*, 1995 ; Jackson, 1997).



entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. Il fixe par ses chaînes GAGs, la fibronectine ou le collagène et par sa partie cytoplasmique, les protéines ERM et l'ankyrine qui est également une protéine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette. De plus, l'interaction avec l'acide hyaluronique augmente l'expression de VCAM-1 et ICAM-1 facilitant l'extravasation des leucocytes (Isacke & Yarwood, 2002). L'association entre le CD44 et les ERM se fait grâce à deux régions basiques du domaine cytoplasmique situées à proximité de la membrane. Cette interaction est régulée par une PKC (Legg *et al.*, 2002).

L'interaction entre l'extrémité N-terminale du CD44 et l'acide hyaluronique est responsable de l'activité pro-métastatique du CD44. Cette liaison active des tyrosines kinases de la famille Src, des RhoGTPases et des protéines du cytosquelette. Dans des cellules de cancer du sein, l'activation de RhoA permet à la kinase ROK de phosphoryler le domaine cytoplasmique du CD44v3,8-10. Cette phosphorylation augmente l'interaction entre le protéoglycane et l'ankyrine, augmentant la motilité des cellules tumorales (Bourguignon *et al.*, 1999). Quant aux protéines c-Src et p185<sup>her2</sup>, elles vont favoriser la progression tumorale, en modifiant l'assemblage de l'actine *via* des interactions avec respectivement la cortactine ou le Vav-2, un GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) (Bourguignon *et al.*, 2001a ; Bourguignon *et al.*, 2001b). De même, la progression tumorale est favorisée par la liaison à l'acide hyaluronique *via* l'activation de Rac-1 (Bourguignon *et al.*, 2000). Plus récemment, ces mêmes auteurs ont montré que cette interaction CD44/acide hyaluronique régule la migration tumorale en induisant la formation du complexe Cdc42/IQGAPI/F-actine (Bourguignon *et al.*, 2005).

La migration des cellules est facilitée par la dégradation de la matrice extracellulaire. Le CD44 module la sécrétion et l'activation de la MMP-2 et fixe la MMP-9 active à la surface des cellules cancéreuses. Ce phénomène va amplifier la dégradation de la matrice et permettre d'activer le TGF- $\beta$  impliqué dans l'angiogénèse et la croissance tumorale (Bourguignon *et al.*, 1998 ; Yu & Stamenkovic, 1999).

#### - Fonction de co-récepteur

L'activation des cellules B par la stimulation du BCR (*B-cell receptor*) ou du CD40 induit l'expression du CD44v3, ce qui permet aux cellules de fixer le HGF. Un complexe ternaire entre le CD44v3, le HGF et le récepteur tyrosine kinase c-Met se crée, induisant la forte phosphorylation de c-Met et l'activation de molécules de signalisation telles que Gab-1 (Grb2-associated binder-1), AKT et p44/p42 MAPK. Cet effet est spécifique du core protéique du CD44v3 mais nécessite la fixation du facteur de croissance sur la chaîne HS, soulignant l'implication de ce protéoglycane dans la différenciation des cellules B (van der Voort *et al.*,

1999 ; 2000). La même équipe a poursuivi ces travaux dans les cellules du cancer du colon. Le CD44v3 y est fortement exprimé ainsi que le récepteur c-Met et le HGF/SF. L'interaction du facteur de croissance avec le CD44v3 conduit à l'activation de c-Met et de la voie Ras-MAPK, induisant l'augmentation de la motilité cellulaire (Wielenga *et al.*, 2000). Les données cliniques relient l'expression du CD44v3 à un mauvais pronostic notamment dans les cas de cancers du sein et du colon (Götte & Yip, 2006). Le CD44v3 est d'ailleurs l'isoforme la plus exprimée dans les tumeurs très agressives (Bourguignon *et al.*, 1998).

Les facteurs de croissance ne sont pas les seuls à utiliser le CD44v3 comme co-récepteur. Les travaux de Proudfoot *et al.* (2003) ont montré que les chimiokines doivent se fixer sur les chaînes HS des protéoglycanes pour induire le chimiotactisme *in vivo*. Récemment, ils ont montré que Rantes active les lymphocytes T par une voie indépendante de son récepteur protéique. En effet, la chimiokine induit la phosphorylation du CD44v3 sur des résidus de tyrosine présents dans la partie cytoplasmique et la formation d'un complexe de signalisation comprenant les Src kinases, p125FAK et la protéine adaptatrice Shc. Ce complexe permet l'activation de la voie p44/p42 MAPK par la chimiokine et facilite l'entrée du virus HIV dans les cellules. Aucun effet n'est constaté par la fixation de Rantes sur les cellules transfectées avec le syndécan-1. L'absence de CD44v3 par l'utilisation de siRNA inhibe l'activation de la voie p44/p42 MAPK, démontrant l'importance de ce protéoglycane en tant que récepteur de Rantes (Roscic-Mrkic *et al.*, 2005).

### c) Régulation de l'expression du CD44

De nombreux travaux ont relaté une surexpression du CD44 lors de changements physiologiques. Ces surexpressions ont prouvé l'implication du CD44 dans le cancer et les maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde. Il augmente la migration cellulaire impliquée dans la formation de métastases et dans le recrutement cellulaire au site de l'inflammation (Bourguignon *et al.*, 1999 ; Naor & Nedvetzki, 2003 ; Götte & Yip, 2006).

Comme pour les syndécans, le domaine extracellulaire du CD44 est libéré par clivage protéolytique grâce à l'action de sérine protéases, de MMPs ou de ADAMS (Okamoto *et al.*, 1999a ; 1999b ; Kajita *et al.*, 2001 ; Ahrens *et al.*, 2001 ; Thorne *et al.*, 2004). Ce shedding se produit spontanément ou en réponse à une cytokine et son efficacité est dépendante des variants. La MT1-MMP, une forme membranaire de MMP libère un fragment soluble de 70 kDa. La forme tronquée va pouvoir fixer les ligands et entrer en compétition avec la forme membranaire. Les travaux de Arhens *et al.* (2001) ont montré que cette compétition envers l'acide hyaluronique inhibe la croissance tumorale, soulignant l'utilisation de formes tronquées dans le traitement du cancer. Toutefois, il a été constaté que le clivage du CD44 par

MT1-MMP facilite le détachement des cellules cancéreuses et leur migration des cellules (Thorne *et al.*, 2004). La partie cytoplasmique est alors dirigée vers le noyau où elle régule la transcription. En particulier, ce fragment augmente l'expression du CD44 lui-même, permettant l'expression de nouveaux variants (Okamoto *et al.*, 2001 ; Isacke & Yarwood, 2002 ; Thorne *et al.*, 2004).

#### C. 2.4. Le bétaglycan

A la différence des autres HSPG, le bétaglycan existe sous une seule forme. Il possède deux sites d'insertion pour les GAGs localisés au centre de la protéine qui peuvent être substitués par des chaînes HS et CS (Lopez-Casillas *et al.*, 1991 ; Gold *et al.*, 1999 ; Kramer & Yost, 2003). Il est également appelé récepteur de type III du TGF- $\beta$ . En effet, il peut fixer la cytokine par ses chaînes GAGs ou son core protéique et le présenter aux récepteurs protéiques (type I/II) qui sont des récepteurs serine/thréonine kinases (Lopez-Casillas *et al.*, 1994 ; Reiss & Barcellos-Hoff, 1997 ; Delehedde *et al.*, 2002). Son domaine extracellulaire riche en cystéine permet la fixation de protéines de la famille du TGF- $\beta$  et son court domaine intracellulaire peut être phosphorylé et fixer des protéines à domaine PDZ (Blobe *et al.*, 2001 ; Kramer & Yost, 2003). Stenvers *et al.* (2002) ont montré que le bétaglycan est nécessaire au développement du cœur et du foie par un mécanisme dépendant du TGF- $\beta$ .

Toutefois, le rôle du bétaglycan dans l'activité du TGF- $\beta$  est controversé. Il est capable d'inhiber la signalisation de certains membres de la famille du TGF- $\beta$ . L'activine, un membre de cette famille régule la prolifération et la différenciation cellulaires. Lewis *et al.* (2000) ont montré que l'inhibine se fixe sur le bétaglycan et empêche l'accès de l'activine à ses récepteurs de signalisation. Dans certains types cellulaires, la fixation du TGF- $\beta$  sur le bétaglycan inhibe l'association des récepteurs I et II, par un mécanisme dépendant de la longueur de ses chaînes HS (Eickelberg *et al.*, 2002). La perte du betaglycan dans les cellules cancéreuses conduit à une augmentation de la motilité cellulaire et de la tumorigénèse, suggérant un rôle suppresseur de tumeur du bétaglycan (Turley *et al.*, 2007 ; Sharafi *et al.*, 2007).

L'expression du bétaglycan à la membrane plasmique est dépendante de son interaction avec une protéine à domaine PDZ, la GIPC (*Gaip-interaction protein C terminus*). La régulation de l'expression du bétaglycan passe également par un clivage protéolytique. Les ectodomains libérés vont servir de récepteurs antagonistes (Andres *et al.*, 1989 ; Reiss & Barcellos-Hoff, 1997 ; Kramer & Yost, 2003).

### C. 3. Interaction entre les HS et les cyclophilines

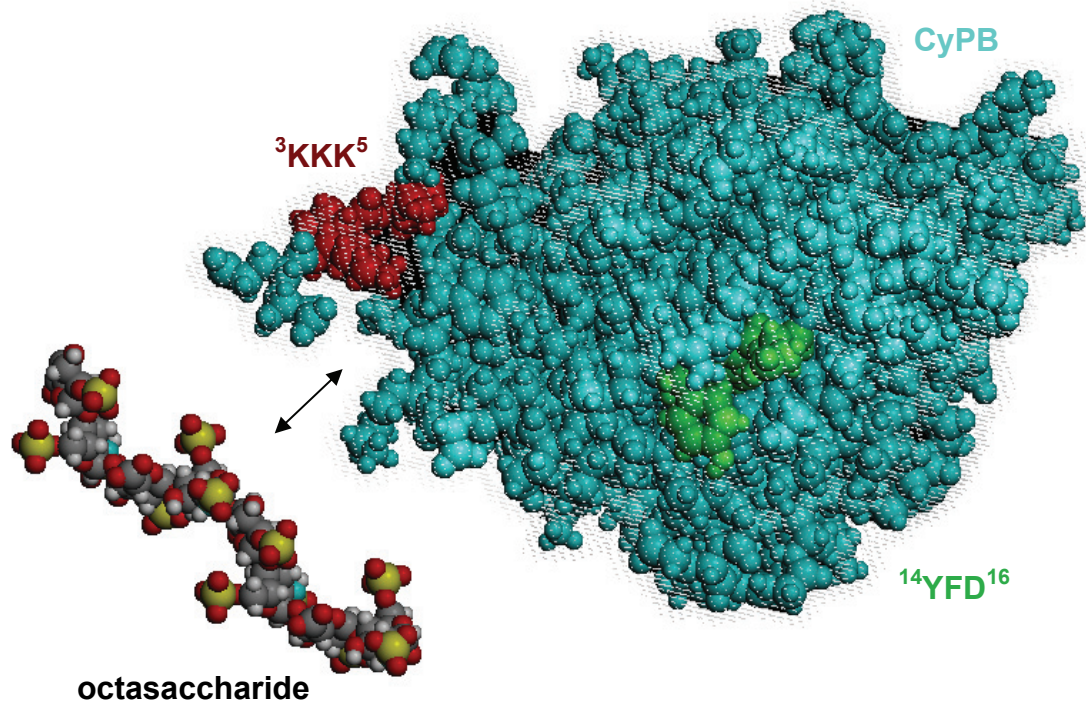
Dès 1996, Allain *et al.* ont suggéré l'existence de sites de fixation non protéiques à la surface des lymphocytes T puisque seul 20% de la CyPB est endocytée. Comme la partie N-terminale de la CyPB est basique, elle a la propriété d'interagir avec les échangeurs de cations tels que l'ADN et l'héparine (Galat & Bouet, 1994). Cette interaction est rompue par une solution en NaCl concentrée et est diminuée de moitié par un traitement à l'héparinase. Les sites glycaniques identifiés à des HSPG représentent le site de type II. Ils sont environ 3 fois plus nombreux que les sites de type I ( $25000 \pm 10000$  pour le site de type I *versus*  $70000 \pm 25000$  pour le site de type II) et le Kd estimé est de  $10,5 \pm 1,5$  nM (Denys *et al.*, 1998a). L'hétérogénéité de fixation de la CyPB sur les cellules s'explique par l'expression variable de ses deux types de récepteurs.

Mariller *et al.* (1996) ont montré que l'extrémité N-terminale de la CyPB est directement impliquée dans la fixation au site de type II. Cette région contient la séquence basique  $^1\text{DEKKKGPK}^8$ , proche des séquences consensus impliquées dans les interactions entre les GAGs et les HBPs. En effet, certaines séquences protéiques consensus telles que BXXBBXB ; BXXBXB ; BXXBBXXXBBXXB (où B = AA basique) ont été décrites comme motifs impliqués dans la fixation des HBPs (Cardin & Weintraub, 1989 ; Gallagher *et al.*, 2001 ; Esko & Selleck, 2002 ; Rabenstein *et al.*, 2002).

L'utilisation de peptides obtenus par protéolyse ou de mutants de CyPB au niveau de l'extrémité N-terminale (CyPB<sub>KKK-</sub> et CyPB <sub>$\Delta$ YFD</sub>) ont permis de confirmer l'importance du groupement  $^3\text{KKK}^5$  et de révéler l'implication du tripeptide  $^{14}\text{YFD}^{16}$  dans la fixation de la CyPB aux héparanes sulfates présents à la surface des lymphocytes T (Carpentier *et al.*, 1999b). Ce tripeptide YFD a déjà été décrit comme un motif de liaison du collagène IV à l'héparine et serait directement impliqué dans l'adhérence cellulaire (Koliakos *et al.*, 1989 ; Wilke & Eurcht, 1990). Cette séquence pourrait renforcer les interactions ioniques des héparanes sulfates chargés négativement avec les trois lysines  $^3\text{KKK}^5$  de la CyPB (Carpentier *et al.*, 1999b). Malgré la présence d'un groupement RKR homologue à celui de la CyPB, la CyPC ne se fixe aux GAGs qu'avec une faible affinité. Ces données suggèrent que le groupement YFD serait à l'origine de la spécificité et de la force d'interaction entre les chaînes héparanes sulfates et la CyPB. Les mutants modifiés dans d'autres régions de la CyPB se fixent normalement aux GAGs, confirmant que seul le peptide N-terminal est impliqué dans les interactions avec le site de type II (Figure 8).

Les tripeptides KKK et YFD sont juxtaposés et délimitent une gouttière susceptible de recevoir un octasaccharide. En réalisant des expériences de retard sur gel à partir de

complexes entre la CyPB et des oligosaccharides de différentes tailles, Vanpouille *et al.* (2004) ont confirmé que la taille minimale du motif héparinique reconnu par la CyPB correspond à un octasaccharide (Figure 15).



**Figure 15:** Représentation tridimensionnelle de l'interaction entre la CyPB et un octasaccharide (Vanpouille *et al.*, 2004).

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,  $^{148}\text{RNGKTSKK}^{155}$ , localisée dans l'extrémité C-terminale de la protéine, comme impliquée spécifiquement dans ces interactions. Toutefois, il semble que l'absence d'extension N-terminale explique pourquoi l'interaction entre la CyPA et les chaînes HS est faible. En effet, elle 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 n'entre pas en compétition avec la CyPB fixée sur l'héparine ou sur les sites glycaniques des lymphocytes T (Denys *et al.*, 1998a ; Saphire *et al.*, 1999). La présence de chaînes HS semble cependant importante à l'activation du flux calcique et de la voie p44/p42 MAPK par la CyPA (Yurchenko *et al.*, 2002).

Un rôle des chaînes HS a été suggéré dans les phénomènes de sensibilité lymphocytaire à la CsA. En effet, la concentration de CyPB plasmatique augmente chez les sujets transplantés traités à la CsA. Complexée à la CsA, la CyPB peut interagir uniquement

avec les 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 pour exercer son activité immunosuppressive (Allain *et al.*, 1996 ; Denys *et al.*, 1998a ; 1998b). 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 protéoglycanes membranaires.

## **D/ Réponses induites par les cyclophilines extracellulaires**

### **D. 1. Mécanismes de signalisation**

La caractérisation de fonctions biologiques et l'identification de récepteurs suggèrent que les cyclophilines sont des médiateurs extracellulaires. Ces constatations soulèvent l'existence de voies de signalisation activées par ces protéines.

Les travaux menés sur les cyclophilines ont montré que leur fixation engendre un flux calcique intracellulaire (Yurchenko *et al.*, 2001 ; 2002 ; Allain *et al.*, 2002). La CyPB induit une élévation du taux de  $Ca^{2+}$  cytosolique ( $550 \pm 240$  nM *versus*  $95 \pm 15$  nM) dans les lymphocytes T. Les cellules répondent à la CyPA dans une moindre mesure ( $220$  nM  $\pm$   $60$  nM). L'utilisation de mutant de CyPB incapable de se fixer aux chaînes GAGs (CyPB<sup>KKK-</sup>) présente une efficacité réduite et similaire à celle observée pour la CyPA. Ces données suggèrent que les chaînes HS ne sont pas essentielles à la génération du flux calcique mais qu'elles servent à potentialiser l'effet de la CyPB (Allain *et al.*, 2002). Les travaux de Yurchenko *et al.* (2001) montrent que les cyclophilines induisent un flux calcique dans les cellules CHO à condition qu'elles soient transfectées avec le CD147, soulignant l'importance du CD147 dans les réponses induites par les cyclophilines.

La fixation des cyclophilines induit la phosphorylation des protéines kinases p44/p42 MAPK dans les lymphocytes T, les cellules endothéliales, les myocytes cardiaques, les cellules pancréatiques cancéreuses et même les neurones (Yurchenko *et al.*, 2001 ; 2002 ; Jin *et al.*, 2004 ; Seko *et al.*, 2004 ; Boulos *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2006). Comme pour le flux calcique, l'activation des MAPK par les cyclophilines nécessite la présence du CD147, suggérant son implication comme sous-unité du récepteur des cyclophilines. Les cellules CHO transfectées avec un mutant du CD147 modifié au niveau d'un résidu de Proline (Pro<sup>180</sup>) ne répondent plus à la CyPA. Par ailleurs, la mutation du site enzymatique des cyclophilines inhibe les réponses cellulaires (Carpentier *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2002). Ces travaux

suggèrent que les cyclophilines doivent isomériser le résidu de proline pour induire un signal. Dès lors, le CD147 a été considéré comme récepteur de signalisation des cyclophilines.

Plus récemment, d'autres voies de signalisation activées par les cyclophilines ont été décrites. L'adhérence cellulaire des lymphocytes T induite par la CyPB requiert la participation des PI3-K puisque leur inhibiteur, la wortmaninne, empêche l'adhérence cellulaire (Allain *et al.*, 2002). Contrairement aux travaux de Yurchenko *et al.* (2002), Jin *et al.* (2004) ont montré que la CyPA active également les voies JNK et p38 MAPK. La même année, une étude sur des myocytes de rat a montré que la CyPA induit l'activation de p38 MAPK, de JNK et même de Akt (PKB) (Seko *et al.*, 2004). Enfin, la voie NF- $\kappa$ B est activée dans les cellules endothéliales et les monocytes en réponse à la CyPA (Jin *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2005).

La multiplicité des voies de signalisation activées par les cyclophilines est caractéristique de celles qui sont activées par les facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , ce qui est en faveur d'un rôle des cyclophilines comme médiateurs de l'inflammation.

## **D. 2. Réponses cellulaires**

De nombreuses activités biologiques ont été attribuées aux cyclophilines. La première à avoir été décrite est le chimiotactisme. Dès 1992, Xu *et al.* et Sherry *et al.* ont mis en évidence que la CyPA isolée de thymocytes bovins et la CyPA recombinante possèdent une activité chimioattractante envers les éosinophiles, les neutrophiles et les monocytes du sang. D'autres travaux ont confirmé ces résultats. Allain *et al.* (2002) ont montré que la réponse chimioattractante induite par la CyPB est variable selon les populations lymphocytaires. Ainsi, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> répondent plus efficacement que les CD8<sup>+</sup> et les lymphocytes mémoires CD45RO<sup>+</sup> sont plus sensibles que les lymphocytes naïfs CD45RA<sup>+</sup>. Récemment, Damsker *et al.* (2007) ont repris ces constatations et mis en évidence que les cellules CD4<sup>+</sup> activées répondent plus aisément à la CyPA. Cette activité est dépendante du CD147 car elle est inhibée en présence d'anticorps bloquants anti-CD147 (Yurchenko *et al.*, 2001 ; 2002 ; Damsker *et al.*, 2007). Alors que les travaux de Allain *et al.* (2002) accordaient peu d'importance aux chaînes HS dans l'activité chimioattractante de la CyPA, les récents travaux de Damsker *et al.* (2007) démontrent le contraire en ce qui concerne le recrutement des neutrophiles et les lymphocytes CD4<sup>+</sup> non activés. En revanche, le recrutement des lymphocytes CD4<sup>+</sup> activés par la CyPA semble être indépendant de la présence des chaînes HS. Ces données suggèrent que les sous-populations lymphocytaires répondent différemment

aux cyclophilines. Les populations activées répondent plus facilement, ce qui favorise leur recrutement dans le contexte inflammatoire.

Des travaux menés au Laboratoire ont montré que la CyPB induit l'adhérence des lymphocytes T sur la fibronectine, par un mécanisme dépendant de l'activation des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$  (Allain *et al.*, 2002 ; Carpentier *et al.*, 2002). Cette activité est spécifique de la CyPB, suscitant la participation d'un HSPG membranaire comme co-récepteur. Elle met en jeu également le CD147, l'activité PPIase et les PI3-K. De même, les travaux réalisés avec des sous-populations lymphocytaires montrent que la CyPB agit préférentiellement sur les  $CD4^+$  que sur les  $CD8^+$  et notamment sur les lymphocytes mémoires  $CD4^+CD45RO^+$ . Ces effets biologiques confirment l'implication des cyclophilines comme facteurs inflammatoires responsables du recrutement des cellules sur le site de l'inflammation. Leur sélectivité vis-à-vis des sous-populations laisse supposer qu'elles régulent l'infiltration leucocytaire.

D'autres données ont confirmé le classement des cyclophilines parmi la famille des facteurs inflammatoires. Récemment, la CyPA a été décrite pour induire la synthèse de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, l'IL-1 $\beta$  et le MCP-1 (Kim *et al.*, 2005). Une étude récente a montré que la CyPA augmente la sécrétion d'IL-5 et IL-17 par des cellules cancéreuses pancréatiques (Li *et al.*, 2006). De plus, la CyPA favoriserait la sécrétion de MMP9 par des cellules pro-monocytaires humaines et des macrophages murins. Elle induirait également l'interconversion de la pro-MMP2 en sa forme active dans les cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2004a).

### **D. 3. Implication des cyclophilines dans les pathologies inflammatoires**

#### D. 3.1. La polyarthrite rhumatoïde

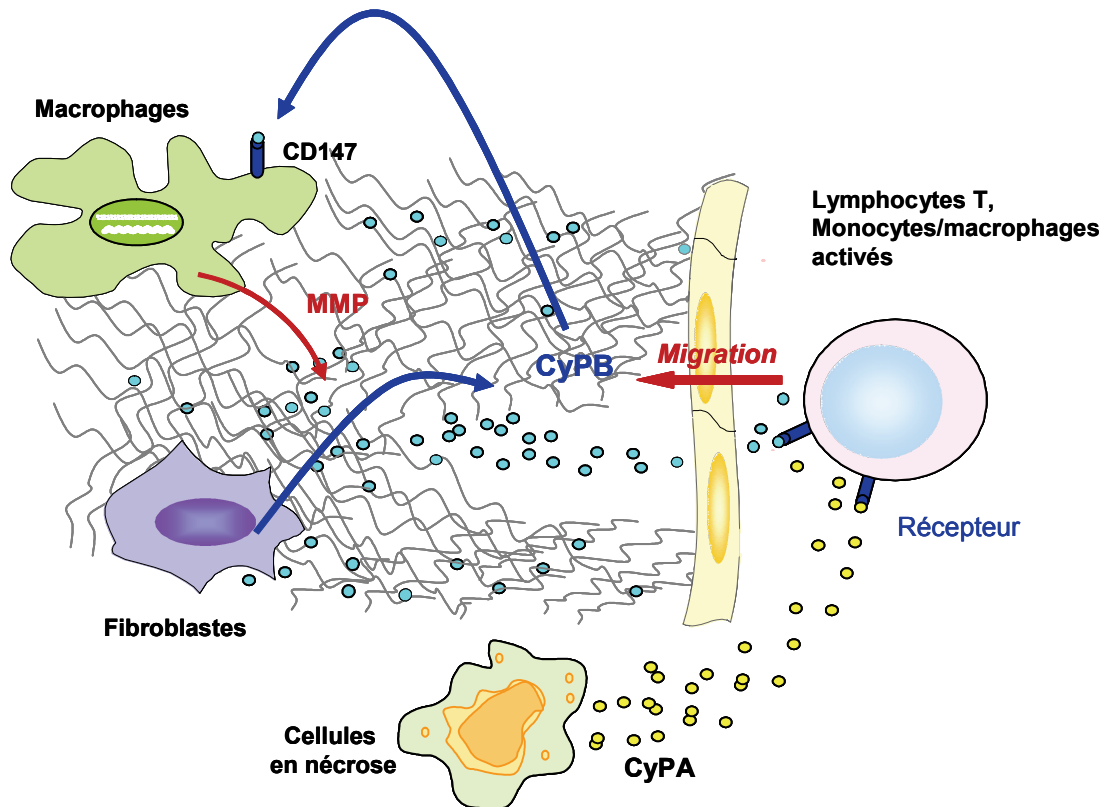
Les données décrites ces dernières années placent les cyclophilines sécrétées parmi les médiateurs de l'inflammation. Les modèles utilisés dans ces travaux montrent l'implication de ces protéines dans certaines pathologies et tout particulièrement dans la polyarthrite rhumatoïde. Il s'agit d'une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique, évoluant par poussées et conduisant à la destruction progressive des articulations. C'est la maladie rhumatismale chronique la plus fréquente chez l'adulte dont le déclenchement reste inconnu. La membrane synoviale qui tapisse les articulations sécrète la synovie. Lors de la pathologie, cette membrane devient alors une zone inflammée où les fibroblastes interagissent avec les leucocytes en cours de recrutement. Une réaction inflammatoire non-spécifique crée une accumulation locale de macrophages qui produisent



des cytokines inflammatoires. Ces facteurs inflammatoires induisent le recrutement de lymphocytes T et de polynucléaires grâce à leur activité chimioattractante et l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales. Cette zone devient alors un lieu de développement chronique de la maladie conduisant à la destruction des articulations (Pap, 2005). Les macrophages ont un rôle central dans cette pathologie car ils possèdent de fortes capacités pro-inflammatoires aboutissant au remodelage et à la destruction des articulations. Ils contribuent considérablement au développement de la maladie dans les phases aiguës comme chroniques. En effet, ces cellules constituent la principale source de facteurs pro-inflammatoires ou régulateurs comme les cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-10...), les facteurs de croissance (GM-CSF) et les chimioattractants (IL-8, MCP-1, ...). Elles induisent aussi l'expression et la libération de MMPs, enzymes à l'origine de la destruction de la matrice extracellulaire et de la dégradation des articulations. Néanmoins, l'activation de la lignée monocytique ne se restreint pas aux macrophages de la synovie, mais touche également les monocytes circulants et autres cellules du système phagocytaire mononucléé dont les précurseurs de la lignée myélomonocytaire de la moelle osseuse. Ces cellules vont coloniser les couches superficielles et profondes de la membrane synoviale (Kinne *et al.*, 2000). Il existe d'ailleurs une corrélation entre la progression de la maladie et le degré d'infiltration des monocytes (Mulherin *et al.*, 1996 ; Tak *et al.*, 1997). Depuis quelques années, l'importance du rôle des fibroblastes dans la pathologie a été largement documentée. Ils forment d'actifs effecteurs du déroulement de la maladie. Comme pour les macrophages, ils induisent l'expression de cytokines et de chimiokines, ainsi que des protéases et des molécules d'adhérence qui vont participer à la dégradation des articulations (Huber *et al.*, 2006).

Les cyclophilines entretiennent ce contexte inflammatoire. En effet, elles y sont fortement sécrétées et peuvent induire le recrutement de cellules inflammatoires qui vont entretenir leur propre sécrétion et participer à la chronicité. De plus, des travaux complémentaires ont montré l'implication du CD147 dans cette pathologie. Il a été décrit par Ellis *et al.* (1989) et Biswas *et al.* (1995) comme un inducteur de métalloprotéinases. Son expression est fortement augmentée sur les cellules impliquées dans la maladie et serait corrélée à l'augmentation d'expression des métalloprotéinases. Il est dès lors considéré comme un facteur important dans la progression de la destruction articulaire (Konttinen *et al.*, 2000 ; Tomita *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2005 ; 2006). Zhu *et al.*, (2005) ont par ailleurs prouvé que la sécrétion de MMPs est augmentée lors d'expériences de co-cultures de macrophages et de fibroblastes par rapport à des cultures séparées. Elles permettent d'augmenter leur pouvoir invasif des cellules. Ces données suggèrent que le taux de MMPs détecté dans cette pathologie puisse s'expliquer par les interactions possibles entre macrophages et fibroblastes

dans la membrane synoviale. Ces effets sont inhibés par l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre le CD147, confirmant son rôle dans la pathologie. En induisant l'expression de MMPs, les cyclophilines provoqueraient leur libération des protéoglycanes de la matrice extracellulaire où elles sont piégées et amplifieraient la destruction des cartilages en favorisant la production de ces enzymes (Figure 16) (De Ceuninck *et al.*, 2003).



**Figure 16:** Implication des cyclophilines sécrétées dans la polyarthrite rhumatoïde  
 Les cyclophilines sécrétées en abondance dans cette pathologie vont recruter des leucocytes sur le site de l'inflammation. En activant le CD147, qui est surexprimé dans la pathologie, elles induiraient l'expression de MMPs responsables de la dégradation articulaire. La destruction de la matrice extracellulaire va libérer la CyPB piégée par les HSPG, ce qui va entretenir le contexte inflammatoire et promouvoir la pathologie.

### D. 3.2. Autres pathologies inflammatoires

La CyPA est sécrétée par les cellules de muscles lisses des vaisseaux sanguins en réponse à un stress oxydatif et induit le recrutement de leucocytes et l'activation des cellules endothéliales, ce qui peut promouvoir la progression de maladies vasculaires comme l'athérosclérose (Jin *et al.*, 2004).

L'importance de l'interaction entre la CyPA et le CD147 dans les réponses inflammatoires a été confirmée *in vivo* par Arora *et al.* (2005) en utilisant un modèle d'inflammation aiguë du poumon chez la souris. L'inhibition de l'interaction par l'utilisation d'anticorps bloquants anti-CD147 ou d'analogues non-immunosuppresseurs de CsA réduit le taux de neutrophiles tissulaires de plus de 50%, concomitant avec une diminution de la maladie. Cette étude est la première à démontrer la réelle contribution de la CyPA dans les pathologies inflammatoires. De même, dans un modèle murin d'asthme allergique, ces auteurs ont montré que l'utilisation d'anticorps anti-CD147 diminue *in vivo* le taux d'éosinophiles et de lymphocytes T activés et la sécrétion des cytokines Th2. Par ailleurs, ce traitement réduit la production de mucus par les cellules épithéliales des voies aériennes et l'hyperactivité bronchiale (Gwinn *et al.*, 2006).

#### **D. 4. Activité mitogène**

Caroni *et al.* (1991) ont montré que la CyPB sécrétée était un facteur de croissance pour les cellules embryonnaires de la moelle épinière, les fibroblastes et les cellules cardiaques de poulet *in vitro*. Plus tard, Jin *et al.* (2000) ont montré que la CyPA extracellulaire augmente la prolifération de cellules de muscles lisses vasculaires en réponse à un stress oxydatif. Ce phénomène est dépendant de l'activation de la voie p44/p42 MAPK. Selon les travaux de Yurchenko *et al.* (2001 ; 2002), les activités biologiques des CyPA et CyPB seraient associées à l'activation de ces kinases, initialement décrites dans les mécanismes de prolifération et de survie cellulaire. L'activité PPIase des cyclophilines semble nécessaire à l'activation des MAPK. De plus, la CyPA sécrétée par des cellules endothéliales en réponse au LPS, agit de façon autocrine sur la prolifération de ces cellules. Toutefois, le taux de CyPA doit être régulé. La concentration doit être d'environ 10 ng/ml car une concentration très élevée (2µg/ml) produit l'effet inverse (Kim *et al.*, 2004a). Une étude récente a montré que le CD147 et la CyPA sont surexprimés dans les tissus cancéreux pancréatiques. La CyPA sécrétée va induire la prolifération des cellules par un mécanisme dépendant du CD147. En augmentant l'expression du ligand et du récepteur, la cellule cancéreuse favorise sa croissance. Par ailleurs, la CyPA induit la sécrétion d'IL-5 et IL-17 qui vont participer au développement de la tumeur (Li *et al.*, 2006). Les activités mitogènes des CyPA et CyPB ne sont toutefois pas comparables à celles des facteurs de croissance habituels.

La CyPA est également impliquée dans la protection de l'apoptose de cellules de muscles lisses vasculaires et neuronales induite par un stress oxydatif. L'addition de CyPA recombinante à des cultures neuronales a un effet neuroprotecteur dans un modèle d'ischémie

*in vivo* (Doyle *et al.*, 1999 ; Jin *et al.*, 2000 ; Boulos *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'activation de p44/p42 MAPK est essentielle à la survie neuronale lors de conditions de stress oxydatif et d'hypoxie. Ces données suggèrent que le pouvoir mitogène attribué aux cyclophilines sécrétées ne serait qu'une conséquence de leurs activités sur le métabolisme et la survie des cellules.

Par contre, des effets indirects des cyclophilines ont été constatés. En effet, Rycyzyn *et al.* (2000) ont montré que la CyPB stimule l'activité mitogène de la prolactine (PRL) dans les cellules mammaires et les lymphocytes T. La prolactine est une hormone peptidique à activité facteur de croissance. Cette activité est classiquement dépendante de sa fixation sur son récepteur fonctionnel, déclenchant ainsi l'activation de la voie Jak2/STAT5. Cette hormone est capable de se lier à la CyPB. Cette interaction induit un phénomène de rétro-translocation du complexe CyPB/PRL vers le noyau. Le complexe interagirait directement avec STAT5, provoquant l'activation de ce facteur de transcription par dissociation de son répresseur PIAS3. La dissociation est rendue possible grâce à l'activité PPIase de la CyPB qui induit un changement de conformation de STAT5. L'utilisation de mutant de CyPB dépourvu d'activité PPIase est incapable de stimuler l'effet mitogène de la prolactine même s'il n'empêche pas la rétro-translocation du complexe dans le noyau. 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). La même équipe a montré par des expériences de co-immunoprécipitations l'existence d'une interaction fonctionnelle entre la CyPA et le récepteur de la PRL. La surexpression de la CyPA prolonge la phosphorylation de Jak-2 et inhibe l'activation de Rac1 induite par la PRL (Syed *et al.*, 2003).

### III. Sujet de thèse

Les données bibliographiques accumulées ces dernières années démontrent la participation des cyclophilines dans des fonctions aussi diverses qu'éloignées de celle de récepteur de la CsA initialement décrite. En effet, les formes sécrétées de CyPA et de CyPB sont désormais considérées comme des médiateurs de l'inflammation. Ces réponses nécessitent l'interaction avec des récepteurs membranaires identifiés à ce jour comme étant le CD147 et les HSPG. Par sa fixation aux chaînes HS, la CyPB induirait l'isomérisation du CD147, un mécanisme nécessaire à l'activation de la voie p44/p42 MAPK et responsable des réponses cellulaires.

Le CD147 est décrit pour participer à de nombreuses fonctions en raison de sa capacité à interagir avec d'autres molécules membranaires. Il est notamment impliqué dans

l'agrégation homotypique des monocytes induite par le CD98. (Cho *et al.*, 2001). Dans ce contexte, il nous est apparu indispensable d'évaluer la participation d'autres molécules associées au CD147 dans les activités des cyclophilines, notamment dans le cas de l'activation des intégrines.

Les chaînes HS permettent de présenter les HBPs à leur récepteur de signalisation. Néanmoins, de plus en plus de données révèlent que le core protéique des protéoglycane sert à la génération de signaux intracellulaires en synergie avec le récepteur protéique. Dans le cas de la CyPB, l'élimination des chaînes HS par un traitement à l'héparinase inhibe l'adhérence des lymphocytes T. Contrairement à ce qui a été démontré dans le cas du FGF-2 (Delehedde *et al.*, 2002c), l'ajout de chaînes solubles ne restaure pas l'activité de la CyPB. Ces résultats suggèrent que la participation du protéoglycane ne se limite pas à la présentation de la CyPB à son récepteur protéique. Nous avons donc cherché à identifier le ou les protéoglycane nécessaires à l'activité de la CyPB, ce qui est essentiel à la compréhension des réponses induites par cette protéine.

La caractérisation des activités des cyclophilines sécrétées démontrent leur participation dans le recrutement des cellules sur le site de l'inflammation. Toutefois, de nombreuses questions restent en suspens quant au rôle de la CyPB dans un contexte inflammatoire. Les données recueillies ces dernières années sont en faveur d'un rôle pro-inflammatoire de la CyPB. Présente dans la matrice extracellulaire, la CyPB est libérée par dégradation des protéoglycane. Les macrophages sont donc les premières cellules susceptibles de répondre à cette protéine. Nous avons donc choisi d'étudier les mécanismes et réponses cellulaires mis en jeu en utilisant la lignée THP-1 différenciée en macrophages.

# Travaux Personnels

---

# Partie I

*Etude de l'interaction entre la CyPB  
et son récepteur membranaire*

# I. Identification du protéoglycane présent dans le récepteur de la cyclophiline B

Les cyclophilines sont caractérisées par leur capacité à fixer la CsA, un médicament immunosuppresseur largement utilisé dans la prévention du rejet de greffe et par leur activité peptidyl prolyl *cis/trans* isomérase. Chez les patients atteints de pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde ou le psoriasis, des taux importants de CyPA et CyPB ont été détectés dans les milieux extracellulaires comme le sérum et les liquides synoviaux. La CyPB est sécrétée constitutivement par les fibroblastes grâce à son peptide signal qui la dirige vers la voie de sécrétion. En revanche, la CyPA est une protéine abondante du cytosol dont le mode de sécrétion reste à élucider. Toutefois, les deux cyclophilines sont sécrétées en réponse au stress oxydatif, aux stimuli inflammatoires et à l'infection virale. De plus, elles possèdent une activité chimioattractante envers de nombreux types cellulaires, les lymphocytes T, les neutrophiles, les éosinophiles et les monocytes (Xu *et al.*, 1992 ; Sherry *et al.*, 1992 ; Allain *et al.*, 2002). En 2002, Allain *et al.* ont montré que la CyPB induit l'adhérence des lymphocytes T à la fibronectine, par un mécanisme dépendant de l'activation des intégrines. L'ensemble de ces données suggère la participation des cyclophilines dans le recrutement des cellules sur le site de l'inflammation.

Les réponses cellulaires induites par les cyclophilines sécrétées ont suggéré la présence de récepteurs à la surface des cellules cibles. Les travaux menés au laboratoire ou par d'autres équipes ont démontré l'existence d'un complexe multimérique impliqué dans la fixation et l'activité des cyclophilines. Il est composé d'une part d'un récepteur protéique dont une des sous-unités est le CD147. L'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre le CD147 ou de CyPB mutée au niveau du site PPIase inhibe les effets des cyclophilines. En parallèle, l'utilisation de lymphocytes T traités à l'héparinase I et de mutants de CyPB a montré que la partie N-terminale de la protéine est impliquée dans une fixation de forte affinité avec les chaînes héparanes sulfates portées par des protéoglycanes membranaires. L'ensemble de ces données démontre que les activités des cyclophilines sont dépendantes de l'interaction avec ces sites de fixation. (Allain *et al.*, 2002 ; Carpentier *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; 2002 ; Arora *et al.*, 2005 ; Gwinn *et al.*, 2006).

Alors que la CyPB induit l'endocytose de son récepteur (Allain *et al.*, 1996 ; Denys *et al.*, 1998a), aucune diminution de l'expression membranaire du CD147 n'a été observé en présence de CyPB. Toutefois, l'activité PPIase de la CyPB et la présence de la proline en



position 180 du CD147 sont essentielles, suggérant que l'interaction entre le CD147 et les cyclophilines correspond à une interaction de type enzyme-substrat. L'isomérisation de cette liaison prolyle serait à l'origine de l'activation des voies de signalisation induites par la CyPB (Allain *et al.*, 2002 ; Carpentier *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2002).

Par sa capacité à interagir avec les chaînes HS, la CyPB peut être considérée comme un membre de la famille des HBPs. Elle contient dans son extrémité N-terminale une séquence riche en lysine connue pour interagir avec les chaînes HS. La mutation des lysines <sup>3</sup>KKK<sup>5</sup> de cette séquence ou du tripeptide <sup>14</sup>YFD<sup>16</sup> inhibe l'interaction entre la CyPB et les chaînes HS. Le motif YFD a déjà été décrit dans la liaison du collagène IV à l'héparine. Les auteurs suggèrent qu'il servirait à renforcer les interactions ioniques entre les HS et les lysines de la CyPB (Carpentier *et al.*, 1999).

Certaines HBPs interagissent spécifiquement avec les chaînes HS. Ainsi des motifs ont été décrits pour l'anti-thrombine ou la protéine gD du HSV. L'activité de la CyPB est dépendante de son interaction spécifique avec les chaînes HS. En effet, elle interagit avec un octasaccharide qui se glisse dans une gouttière formée grâce à la juxtaposition des tripeptides <sup>3</sup>KKK<sup>5</sup> et <sup>14</sup>YFD<sup>16</sup> (Carpentier *et al.*, 2002 ; Vanpouille *et al.*, 2004). La présence des chaînes HS est essentielle à l'adhérence cellulaire induite par la CyPB. L'ajout de chaînes HS solubles ne restaure pas l'activité pro-adhésive de la CyPB sur des cellules préalablement traitées à l'héparinase, suggérant que les HSPG n'ont pas qu'un rôle de présentation de la CyPB au récepteur protéique mais qu'ils pourraient être considérés comme des co-récepteurs (Allain *et al.*, 2002 ; Vanpouille *et al.*, 2004). En effet, les travaux réalisés sur les HSPG ont montré qu'ils étaient capables de moduler l'activité de nombreux médiateurs de l'inflammation. Pour certains de ces facteurs, la chaîne HS sert à présenter le ligand à son récepteur protéique et à stabiliser cette interaction. En revanche, dans certains cas, les HSPG grâce à leur core protéique participent directement à la signalisation induite par les ligands en synergie avec le récepteur protéique. (Volk *et al.*, 1999 ; Derksen *et al.*, 2002 ; Saoncella *et al.*, 2004 ; Hamon *et al.*, 2004).

Notre laboratoire s'est dès lors intéressé à l'étude des interactions entre la CyPB et ses récepteurs. Pour mener à bien cette étude, nous avons continué nos expériences sur les lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> du sang et utilisé en parallèle les cellules de la lignée promonocytaire THP1 différenciées en macrophages par traitement à la 1,25-dihydroxyl-vitamine D3. Ce nouveau modèle d'étude a été choisi car ces cellules fixent et répondent à la CyPB (activation de la voie p44/p42 MAPK, chimiotactisme et adhérence) de façon similaire

aux lymphocytes T et permet de pallier les inconvénients de variabilité interindividuelle et de résistance aux transfections constatés avec les lymphocytes T. Il est à noter qu'aucune fixation sur les cellules non différenciées (type monocytaire) n'est constatée à la surface des cellules THP1 non différenciées, ce qui prouve que la différenciation permet aux cellules d'acquérir les sites de fixation reconnus par la protéine.

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier si un protéoglycane était directement impliqué dans l'activité de la CyPB. Quatre types de HSPG membranaires ont été décrits. Les syndécans, constitués de 4 membres, représentent la principale source de chaînes HS à la surface des cellules. Les glypicans sont également très représentés. Ils existent sous six isoformes et ont la particularité d'être ancrés à la membrane plasmique par un groupement GPI. Enfin, le bétaglycan et le CD44v3 peuvent également porter des chaînes HS. Les résultats obtenus ont démontré que les activités de la CyPB sont dépendantes de sa fixation sur les chaînes HS du syndécan-1 et des interactions de ce dernier avec le CD147.

Ces travaux ont conduit à la publication d'un article dans *Glycobiology* : « Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis ».

## Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis

Rachel Pakula<sup>3\*</sup>, Aurélie Melchior<sup>3\*</sup>, Agnès Denys<sup>3</sup>,  
Christophe Vanpouille<sup>2</sup>, Joël Mazurier<sup>3</sup>, and  
Fabrice Allain<sup>1,3</sup>

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular and Cellular Biophysics, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, MD 20892; and <sup>3</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche No. 8576 du CNRS, Institut de Recherche Fédératif No. 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Received on October 3, 2006; revised on January 12, 2007; accepted on January 19, 2007

Many of the biological functions attributed to cell surface proteoglycans are dependent on the interaction with extracellular mediators through their heparan sulphate (HS) moieties and the participation of their core proteins in signaling events. A class of recently identified inflammatory mediators is secreted cyclophilins, which are mostly known as cyclosporin A-binding proteins. We previously demonstrated that cyclophilin B (CyPB) triggers chemotaxis and integrin-mediated adhesion of T lymphocytes mainly of the CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> phenotype. These activities are related to interactions with two types of binding sites, CD147 and cell surface HS. Here, we demonstrate that CyPB-mediated adhesion of CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T cells is related to p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by a mechanism involving CD147 and HS proteoglycans (HSPG). Although HSPG core proteins are represented by syndecan-1, -2, -4, CD44v3 and betaglycan in CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T cells, we found that only syndecan-1 is physically associated with CD147. The intensity of the heterocomplex increased in response to CyPB, suggesting a transient enhancement and/or stabilization in the association of CD147 to syndecan-1. Pretreatment with anti-syndecan-1 antibodies or knockdown of syndecan-1 expression by RNA interference dramatically reduced CyPB-induced p44/p42 MAPK activation and consequent migration and adhesion, supporting the model in which syndecan-1 serves as a binding subunit to form the fully active receptor of CyPB. Altogether, our findings provide a novel example of a soluble mediator in which a member of the syndecan family plays a critical role in efficient interaction with signaling receptors and initiation of cellular responses.

**Key words:** CD147/cyclophilin B/heparan sulphate/  
syndecan

\*These authors contributed equally to this work.

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

### Introduction

Cyclophilins are ubiquitously distributed proteins, first identified as the main binding proteins for cyclosporin A (CsA), an immunosuppressive drug widely used in the prevention of graft rejection (Handschumacher et al. 1984; Schreiber 1991). They have also been shown to exhibit peptidyl-prolyl *cis*–*trans* isomerase activity (PPIase), which is thought to contribute to the role of these proteins in protein folding (Fischer et al. 1989; Takahashi et al. 1989). Cyclophilins share high sequence homology in the central core, which contains the catalytic and CsA-binding domains, while their C- and N-terminal extensions are structurally unrelated (Galat 1999). Although most studies have focused on the intracellular functions of cyclophilins, accumulating data suggest a role for these proteins as regulators of inflammation. The expression and release of cyclophilin A (CyPA) and B (CyPB) were found increased as a response to inflammatory stimuli, oxidative stress, and viral infection (Sherry et al. 1992; Gonzalez-Cuadrado et al. 1996; Tegeder et al. 1997; Endrich and Gehring 1998; Jin et al. 2000; Arora et al. 2005). Both cyclophilins trigger chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and T lymphocytes, supporting the hypothesis that they may contribute to the guidance of leukocyte populations to inflammatory sites (Sherry et al. 1992; Xu et al. 1992; Yurchenko et al. 2001; Allain et al. 2002; Arora et al. 2005).

We and others have demonstrated that the activities of secreted cyclophilins are related to interactions with CD147, a type I transmembrane protein also known as extracellular matrix metalloproteinase inducer (Pushkarsky et al. 2001; Yurchenko et al. 2001; Allain et al. 2002). By using site-directed mutated ligands, we demonstrated that the central core of CyPB is required for binding to T lymphocytes and consequent initiation of cell responses (Carpentier et al. 2002). Moreover, a proline residue located in an exposed loop of CD147 was found crucial to induce chemotaxis (Yurchenko et al. 2002). These data indicate that cyclophilins trigger common biological responses by a mechanism that involves prolyl isomerization of CD147, making this protein an essential component of the signaling receptor. Intriguingly, we found that only CyPB, but not CyPA, was capable to enhance integrin-mediated adhesion of some T lymphocytes, mainly of the CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> phenotype, to the extracellular matrix. These findings have suggested that CyPB could interact with cell surface binding sites other than CD147, leading to the appearance of additional cell responses. In support of this idea, we found that CyPB is a high-affinity ligand for cell surface heparan sulphate (HS) present at the surface of T cells. Removal of HS by heparinase I treatment abolished the pro-adhesive activity of CyPB, and

the addition of soluble HS could not restore CyPB-initiated adhesion of heparinase-treated T cells, indicating that HS must be present at the membrane of responsive cells (Allain et al. 2002; Vanpouille et al. 2004). Taken together, these data suggest that HS proteoglycans (HSPG) could serve as a second class of binding sites and participate for the unique proadhesive activity of CyPB.

Cell surface HSPG are anchored in the plasma membrane either by a transmembrane domain (syndecans, CD44 variants, and betaglycan) or by glycosylphosphatidylinositol linkage (glypicans) (Bernfield et al. 1999). Syndecans, which are represented by four members (syndecan-1 to -4), are the major source of cell surface HS chains, although syndecan-1 also contains chondroitin sulphate (CS) chains at the glycanation site nearest the plasma membrane. Betaglycan is a unique HSPG, also known as the type-III low-affinity receptor for transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). CD44 is a ubiquitous cell surface adhesion molecule. Different utilization of 10 variable exons, as well as variations in glycosylation, generate multiple isoforms of varying molecular weights. Among this family, only the splice variants CD44v3 are decorated with HS moieties (Jackson et al. 1995). Over the past several years, biochemical, cellular, and genetic studies have converged to reveal that HSPG are critical regulators for growth and inflammatory factors (Selleck 2000; Delehede et al. 2002). Two scenarios have emerged for explaining the functions of these molecules. The first is a well-documented model, in which HS play a role in effective presentation of ligands to their cognate signaling receptor (Yayon et al. 1991; Tanaka et al. 1993; Kuschert et al. 1999). In the second scenario, proteoglycans may function as coreceptors. Interactions of cytosolic domains of syndecans and CD44 variants with cytoskeleton and neighboring signaling molecules have suggested that they may be involved in the regulation of molecular processes related to cell adhesion, migration, and proliferation (Rapraeger and Ott 1998; Ilangumaran et al. 1999; Woods and Couchman 2001).

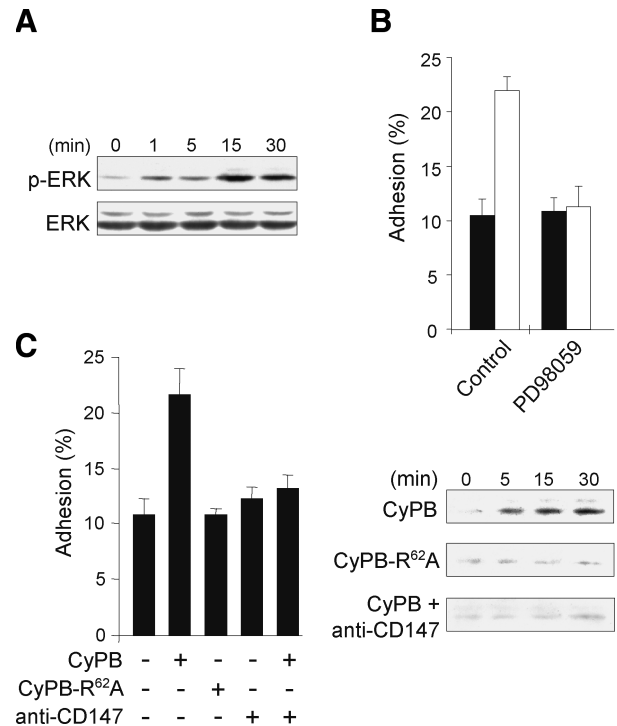
In the current study, we have examined whether HSPG serve as a coreceptor for CyPB. Therefore, we analyzed the expression of HSPG on the plasma membrane of peripheral blood CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes. We then investigated the involvement of cell surface HSPG in the responses triggered by CyPB. Our findings demonstrate that syndecan-1 is a functional coreceptor for CyPB and acts in cooperation with CD147 to induce p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and subsequent cell adhesion and migration of responsive T lymphocytes.

## Results

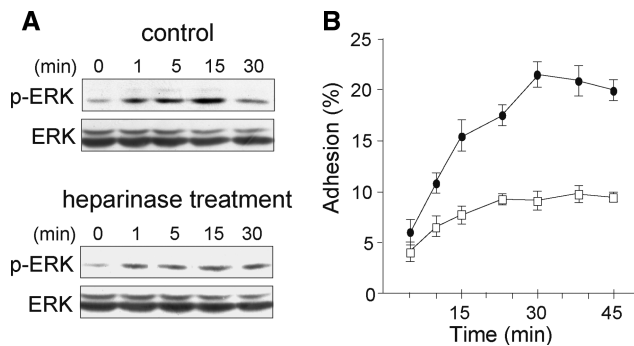
### *Involvement of cell-surface HSPG and CD147 in CyPB-induced responses*

In the previous work, we demonstrated that removal of HS partially reduced Ca<sup>2+</sup> flux and chemotaxis, but potently inhibited cell adhesion to fibronectin (Allain et al. 2002). To further investigate signaling pathways that might be involved in CyPB-induced adhesion of CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T cells, we analyzed the phosphorylation status of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 (p44/42 MAPK), Jun N-terminal kinase (JNK), and p38 MAPK in CyPB-treated cells. A characteristic increase in the level of phosphorylated ERK was observed

after the addition of CyPB (Figure 1A, upper panel). The amount of total ERK was not changed (Figure 1A, lower panel), confirming that CyPB only stimulated the phosphorylation and activation of the preexisting proteins. No such increase in phosphorylation could be detected for JNK and p38 MAPK (data not shown). Time course analysis demonstrated that ERK phosphorylation reached a maximum at 15 min after stimulation. We also determined that fully enhanced adhesion was obtained at 30 min, indicating that ERK phosphorylation occurred before integrin activation (Figure 2B). Moreover, the optimal concentration of CyPB was estimated at 50 nM. Therefore, dose- and time-dependent responses to CyPB for activating ERK phosphorylation paralleled those observed for inducing cell adhesion, suggesting that both events are related. Pretreatment of responsive T lymphocytes with PD98059, a specific inhibitor of p44/42 MAPK pathway activation, inhibited CyPB-mediated cell adhesion to fibronectin, confirming the involvement of ERK activation in this process (Figure 1B). We then confirmed the role of CD147-mediated



**Fig. 1.** Involvement of CD147 and p44/p42 MAPK pathway in CyPB-initiated adhesion of CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes. (A) CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes were either stimulated or not in the presence of 50 nM CyPB for various times and the activation of p44/p42 MAPK was analyzed by using antibodies to phosphorylated ERK1/2 (p-ERK). Parallel immunoblotting with anti-total ERKs confirmed equal loading of samples. (B) Involvement of p44/p42 MAPK in CyPB-initiated adhesion. Following pretreatment or not in the presence of PD98059 (50  $\mu$ M), CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes were incubated either in the absence (filled bar) or the presence (open bar) of 50 nM of CyPB and then allowed to adhere into fibronectin-coated wells. (C) T cells were incubated in the absence or presence of either CyPB (50 nM), CyPB plus anti-CD147 antibodies (10  $\mu$ g/mL) or CyPB<sub>R62A</sub> (50 nM), and thereafter used for analysis of cell adhesion to fibronectin or ERK1/2 phosphorylation. Data are representative of at least three separate experiments conducted with peripheral blood T lymphocytes from different donors. Each bar of histograms represents the mean  $\pm$  SD of triplicate determination of an individual experiment. Results of adhesion assays are expressed as percentages of initially added cells (10<sup>6</sup> per well) remaining associated to the coated well.



**Fig. 2.** Involvement of cell surface HS in p44/p42 MAPK activation and adhesion induced by CyPB. **(A)** Untreated or heparinase I treated  $CD4^+/CD45RO^+$  T lymphocytes were either stimulated or not with of 50 nM CyPB for various times and the phosphorylation status of ERK1/2 was analyzed by western blot. Representative results from at least three independent experiments conducted with T lymphocytes from different donors are shown. **(B)** Untreated (●) or heparinase I treated (○) cells were incubated in the presence of 50 nM CyPB and allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Points represent means  $\pm$  SD of triplicate and results are representative of three separate experiments.

signaling in the responses triggered by CyPB. Addition of antibodies to CD147, but not isotype-matched antibodies, potently abolished ERK activation, which was correlated to the inhibition of CyPB adhesion of  $CD4^+/CD45RO^+$  T cells to fibronectin. Consistent with the requirement of prolyl isomerization for CD147-mediated ERK activation, the mutant  $CyPB_{R62A}$ , which is devoid of enzymatic activity (Carpentier et al. 2002), was unable to induce ERK phosphorylation and to enhance responsive T-cell adhesion to fibronectin (Figure 1C). Altogether, these data support the notion that CD147-mediated ERK activation by CyPB is necessary for triggering of  $CD4^+/CD45RO^+$  T-cell adhesion.

We next investigated the involvement of HS in CyPB-mediated ERK activation. Pretreatment of  $CD4^+/CD45RO^+$  T cells with heparinase I dramatically reduced CyPB-specific ERK phosphorylation (Figure 2A). In a model, in which CyPB binding to HS would be only required to complement low-affinity interactions with CD147, removal of HS should lead to a decrease in the time-course and/or amplitude of CyPB-induced responses, which could be restored by the addition of soluble HS. Here, we found that the effect of heparinase treatment did not cause a delay in ERK activation and subsequent adhesion to fibronectin (Figure 2B). In addition, complementation with heparin or soluble HS derived from T cells did not restore CyPB-induced ERK activation in heparinase-treated T cells, confirming that HS have to be present at the cell membrane of responsive cells. Finally, no more response was seen at higher concentrations of CyPB (data not shown), ruling out a role for HS in the presentation of low concentrations of ligand to signaling receptor. Taken together, these data indicate that CyPB induces ERK activation through CD147 and subsequent cell adhesion by a mechanism involving active participation of cell surface HSPG.

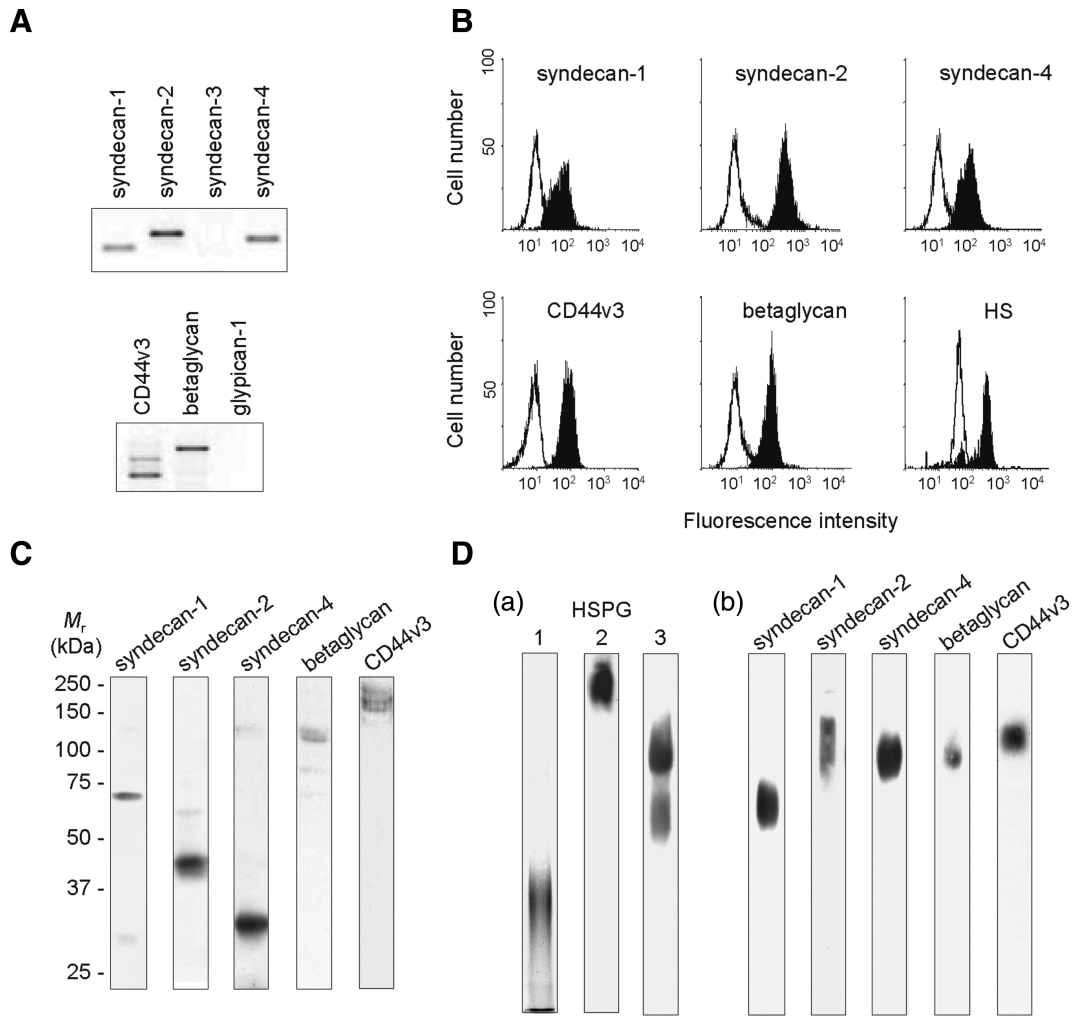
#### *Analysis of HSPG of peripheral blood $CD4^+/CD45RO^+$ T lymphocytes*

Data concerning the expression of HSPG on peripheral blood leukocytes are often controversial in the literature. However,

low expression of these molecules on the cell surface of leukocytes and difficulties to detect their expression by classical immunochemical approaches may explain the variable detection of HSPG reported. To confirm the absence or presence of HSPG core proteins in peripheral blood  $CD4^+/CD45RO^+$  T cells, we used complementary approaches, i.e. reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR), flow cytometry, western blot, and antibody-driven electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

We first checked for the efficiency of PCR primers with control cells, which had been previously reported to express each HSPG. As expected, PCR products were visualized at the predicted sizes and their identity to HSPG core proteins was confirmed by further sequencing (data not shown). We then analyzed the expression of HSPG in peripheral blood  $CD4^+/CD45RO^+$  T lymphocytes. As shown in Figure 3A, PCR products from syndecan-1, -2, -4, CD44v3 isoforms, and betaglycan could be visualized after 30 cycles of PCR amplification. In order to check for the absence of syndecan-3 and glypican-1, PCR amplification was conducted at higher number of cycles but did not show any significant expression of either HSPG (data not shown). As expected, flow cytometry analysis confirmed the presence of syndecan-1, -2, -4, CD44v3, and betaglycan on the cell membrane of  $CD4^+/CD45RO^+$  T lymphocytes (Figure 3B). In contrast, no cell staining could be obtained with antibodies to syndecan-3 or glypican-1. To confirm the absence of members of the glypican family, T cells were treated with phosphatidylinositol phospholipase C, an enzyme used to remove proteins attached to the cell membrane via a GPI anchor. As expected, enzymatic treatment did not reduce either immunostaining of cells with anti-HS antibodies or binding of CyPB (data not shown), supporting the observations that HSPG of the glypican family are not expressed at the membrane of peripheral blood  $CD4^+/CD45RO^+$  T cells. We then checked for the specificity of each anti-HSPG by western blot. As shown in Figure 3C, antibodies to syndecan-1, -2, -4, CD44v3, and betaglycan recognized distinct migrating species, without any cross-reactivity. The apparent molecular masses of deglycanated core proteins of HSPG were estimated to be approximately 70 kDa (syndecan-1), 43 kDa (syndecan-2), 32 kDa (syndecan-4), 115 kDa (betaglycan), and more than 150 kDa (CD44v3 variants). These values are in agreement with those previously observed (Jackson et al. 1995; Drzeniek et al. 1997; Charnaux et al. 2005), confirming the specificity of primary anti-HSPG antibodies. They are, however, higher than predicted ones, which might result from an incomplete deglycanation of HSPG.

Finally, we used an electrophoretic approach to further analyze the expression of HSPG in peripheral blood  $CD4^+/CD45RO^+$  T lymphocytes. We assumed that gel mobility of HSPG could be based on the high negative charges of glycosaminoglycan (GAG) moieties, which make them migrate under native conditions. Indeed, HSPG could be detected as a broad smear after 3 h of electrophoretic migration at 250 mA, electroblotting and immunostaining with anti-HS antibodies. In contrast, preincubation of cell lysates with anti-HS antibodies led to a strong retention of HSPG at the top of the gel, which could be visualized as shifted immune complex after staining with secondary antibodies. To allow the complex to migrate into the gel, electrophoresis was then



**Fig. 3.** Expression of HSPG on CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes: **(A)** Analysis of HSPG specific mRNA by semi-quantitative RT-PCR. GAPDH mRNA was also determined to normalize for input of total RNA. **(B)** Analysis of HSPG expression by flow cytofluorimetry. Reactivity of immunoreactive anti-HSPG antibodies (filled peaks) was compared to appropriate isotype-matched control antibodies (open peaks). **(C)** Analysis of HSPG expression by western blot. Cell surface HSPG were extracted and enriched by anion exchange chromatography on DEAE-sepharose. Following treatment with heparinase I and chondroitinase ABC, deglycanated HSPG were separated on 10% SDS-PAGE, transblotted onto nitrocellulose and immunostained with specific antibodies. **(D)** Analysis of HSPG expression by antibody-driven EMSA. (a) Lane 1: whole cell proteins were separated on 10% native PAGE for 3 h at 250 mA, transblotted onto nitrocellulose and HSPG were immunostained using a two-step procedure with anti-HS antibodies followed by secondary anti-mouse IgM; lane 2: cell lysate was preincubated in the presence of anti-HS antibodies (0.2 μg per lane) prior electrophoresis (3 h at 250 mA) and the immune complex was directly immunostained with peroxidase conjugated anti-mouse IgM antibodies; lane 3: cell lysate was preincubated with anti-HS antibodies and proteins were separated on native PAGE for 8 h at 250 mA prior immunostaining. (b) Cell lysates were preincubated in the presence of specific antibodies to HSPG (0.2 μg per lane). The proteins were then separated on native PAGE for 8 h at 250 mA, transblotted onto nitrocellulose and the immune complexes were directly immunostained with appropriate peroxidase conjugated secondary antibodies. Data are from an individual experiment and are representative of at least 10 separate experiments conducted with peripheral blood T lymphocytes from different donors.

run for 8 h at 250 mA. Under these conditions, two major complexes formed by the association of HSPG with anti-HS antibodies could be visualized (Figure 3D, panel a). Such a differential migration is presumably linked to the nature of GAG modifications. Indeed, it could be hypothesized that anti-HS antibodies potentially reduced the mobility of proteoglycans containing only HS moieties. On the contrary, syndecan-1, and CD44v3 variants also carry additional CS chains, which probably assisted them to migrate faster. We then repeated the experiments using primary antibodies to syndecan-1, -2, -4, betaglycan, and CD44v3. As expected, interaction of the core proteins of HSPG with their respective antibodies led to a delay in their migration, which could be

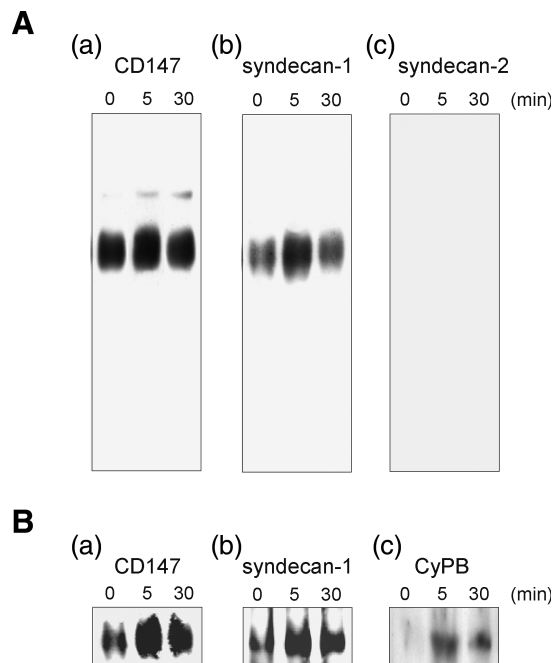
visualized as shifted smears immunoreactive with secondary anti-IgG antibodies (Figure 3D, panel b). Under these conditions, we assumed that the number of GAG chains and the size of core proteins could have opposite influence on the mobility of HSPG. Indeed, the migration of betaglycan and CD44v3 variants, which are large HSPG, was potentially reduced. In contrast, syndecan-1, which is modified with two CS and three HS chains, migrated faster than syndecan-2 and -4, which carry only three HS chains (Bernfield et al. 1999; Delehedde et al. 2002). Treatment of cell lysates with heparinase I and chondroitinase ABC prevented the migration of immune complexes into the gel, confirming that migration of the primary antibodies was dependent on interaction with

and consequent carriage by intact HSPG. No immunoreactive smears were detected on the membrane with isotype-matched control antibodies, showing the specificity of the method. Finally, the use of anti-HSPG antibodies from different species did not modify the mobility of the immune complexes, indicating that the migration is solely dependent on the nature of immunoreactive HSPG (data not shown).

All experiments were conducted with peripheral blood T lymphocytes isolated from at least 10 different healthy donors. Even though some interindividual variation in the expression of HSPG could be observed, the general profiles obtained by RT-PCR and anti-HSPG immunoreactivity assays were similar and allowed us to conclude that CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes express syndecan-1, syndecan-2, syndecan-4, CD44v3, and betaglycan.

#### Role of CyPB in the association of syndecan-1 to CD147

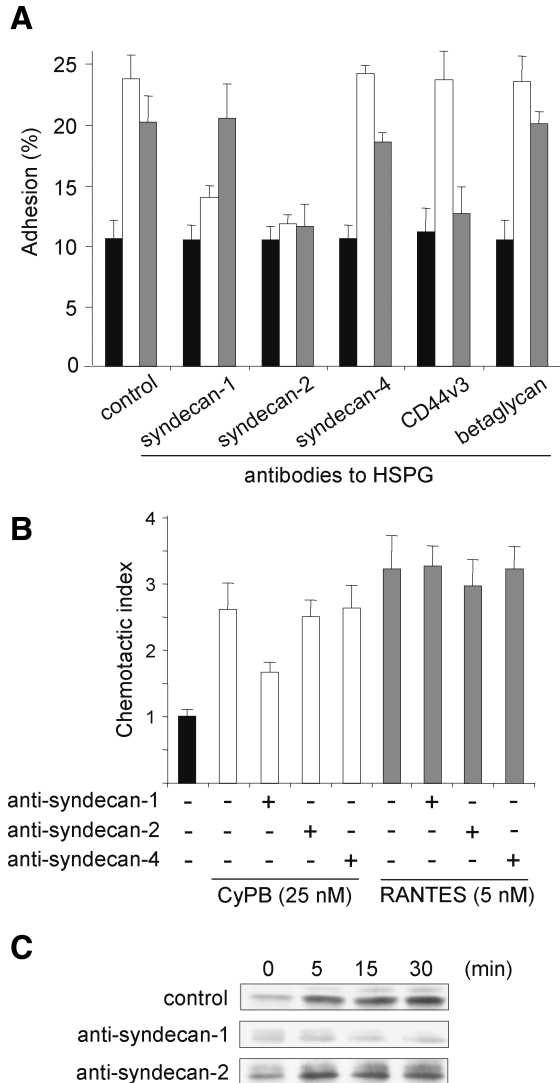
We then analyzed the possibility that CD147 could physically interact with HSPG and form an active complex at the membrane of responsive cells. Consistent with the findings that HS allowed electrophoretic migration of HSPG in native conditions and that interaction of HSPG with specific antibodies resulted in a shifted mobility of the immune complexes, we addressed the possibility that CD147/HSPG complexes could be also visualized by EMSA. To this end, CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes were incubated in the presence of CyPB for various times and thereafter used in EMSA with mouse anti-CD147 antibodies. This method allowed us to visualize immunoreactive shifted smears, which probably correspond to CD147 associated to HSPG (Figure 4A, panel a). To test this hypothesis, cell lysates were treated with heparinase and chondroitinase ABC prior addition of anti-CD147. As expected, the intensity of the immunoreactive smears was dramatically reduced (data not shown), confirming that migration of CD147 was dependent on the presence of GAG. In further experiments, the membrane was reprobed with goat antibodies to HSPG. The complex could be only immunostained with anti-syndecan-1 antibodies, indicating that syndecan-1 (Figure 4A, panel b), but neither syndecan-2 (Figure 4A, panel c) nor other HSPG (data not shown), were associated to CD147. The association of syndecan-1 to CD147 could be observed in the absence of CyPB, suggesting that CD147/HSPG complex preexists at the cell membrane of responsive T lymphocytes. Interestingly, the intensity of the complex increased after 5 min of incubation and decreased thereafter, indicating that CyPB transiently enhanced and/or stabilized the association between CD147 and HSPG. To further test this hypothesis, we reproduced the same experiments and the membrane was reprobed with antibodies to CyPB (Figure 4B). As expected, the protein was found associated to the complex retained with anti-CD147 antibodies. Moreover, we found that the presence of CyPB correlated with the transient increase in the intensity of CD147 and syndecan-1 immunostaining, indicating that binding of the protein to syndecan-1 led to the formation of a ternary complex with CD147. Altogether, these data indicate that the core protein of syndecan-1, but not of other HSPG, is physically associated to CD147 and that the association can be specifically increased and/or stabilized by CyPB.



**Fig. 4.** Association of HSPG to CD147 on CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes. T cells were stimulated or not in the presence of CyPB (50 nM) for increasing times and thereafter lysed. Following preincubation with anti-CD147 antibodies (0.2 μg per lane), cell lysates were separated on 10% native PAGE for 8 h at 250 mA and transblotted onto nitrocellulose. (A) Membrane was either directly immunostained with peroxidase conjugated anti-mouse IgG secondary antibodies (a), or reprobed with goat antibodies to either syndecan-1 (b) or syndecan-2 (c). (B) In next experiments, the immune complexes formed by preincubation with anti-CD147 antibodies (a) were revealed with either goat antibodies to syndecan-1 (b) or rabbit antibodies to CyPB (c). Data are from an individual experiment and are representative of at least three separate experiments conducted with peripheral blood T lymphocytes from different donors.

#### Role of syndecan-1 in CyPB-induced responses

To extend our observations, we used an antibody neutralization strategy to assess the role of CD147/syndecan-1 complex in CyPB-mediated CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T-lymphocyte adhesion. The neutralizing antibodies have been checked for their ability to recognize the ectodomains of immunoreactive HSPG without inhibiting the binding of CyPB to HS moieties. Consequently, an inhibitory effect could be related to a blockade in the association between HSPG and CD147 through steric hindrance. Similar to the results obtained with anti-CD147, mouse antibodies to syndecan-1 potently reduced adhesion of responsive T cells to fibronectin (Figure 5A). As a control, goat antibodies to syndecan-1, which react with an intracellular epitope, were inefficient (data not shown). Antibodies to syndecan-4, CD44v3 and betaglycan had no inhibitory effect in the response triggered by CyPB, further supporting our hypothesis on the role of syndecan-1 in CyPB-induced cell responses. Surprisingly, we found that cell adhesion was strongly decreased in the presence of anti-syndecan-2 antibodies, suggesting that syndecan-2 also participates in T-cell adhesion to fibronectin (Figure 5A). These data were unexpected since we did not observe any association between syndecan-2 and CD147 in EMSA. Because syndecan-2 has been reported to cooperatively act with β1 integrins in cell adhesion, regulation of focal adhesion



**Fig. 5.** Inhibitory effect of anti-HSPG antibodies on CyPB-induced cell responses.  $CD4^+/CD45RO^+$  T lymphocytes were preincubated in the presence of antibodies to HSPG ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) and thereafter used for analysis of CyPB-induced migration, cell adhesion to fibronectin or p44/p42 MAPK activation. (A) T cells were incubated in the absence (filled bars) or the presence of 50 nM CyPB (open bars) or 15 nM RANTES (grey bars) and allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Results are expressed as percentages of initially added cells remaining associated to the coated wells. (B) The chemotactic responses of T cells are expressed as the number of cells migrating to 25 nM CyPB (open bars) or RANTES 5 nM (grey bars) divided by the number of cells migrating to medium alone (filled bar). In both adhesion and migration assays, each bar of the histograms represent mean  $\pm$  SD of triplicate from an individual experiment. (C) T cells were either stimulated or not with 50 nM CyPB for various times and the phosphorylation status of ERK1/2 was analyzed by western blot. Data are representative of at least three separate experiments conducted with peripheral blood T lymphocytes from different donors.

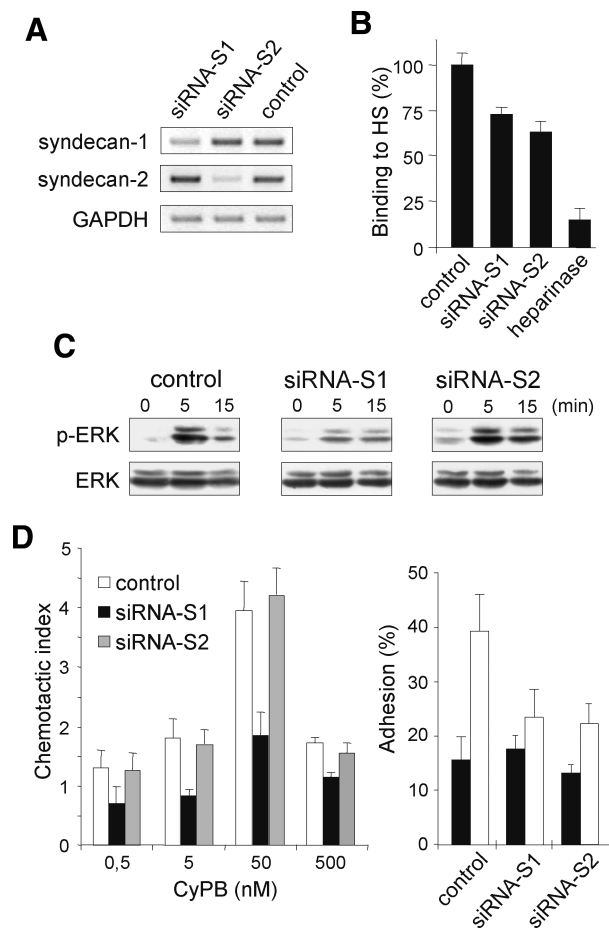
assembly, and stress fiber organization (Itano et al. 1996; Kusano et al. 2000; Muniesue et al. 2002), we hypothesized that it was most probably involved in the regulation of adhesion to fibronectin rather than in CyPB-mediated signaling. To explore this hypothesis, we reproduce the same experiments with the pro-adhesive chemokine regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted (RANTES)/CCL5 (Figure 5A). As expected, RANTES

induced T-cell adhesion to fibronectin to a similar extent than CyPB. The addition of anti-syndecan-1 antibodies did not affect RANTES-mediated T-cell adhesion, indicating that the proteoglycan was not necessary for the responses induced by the chemokine. In contrast, anti-syndecan-2 and anti-CD44v3 antibodies strongly inhibited the adhesion induced by RANTES. The observation that CD44v3 participates in the responses triggered by RANTES was in agreement with the work of (Rosic-Mrkic et al. 2003), who described CD44v3 as a co signaling receptor for the chemokine. Moreover, the findings that anti-syndecan-2 antibodies were inhibitory for CyPB- and RANTES-mediated responses led us to conclude that this HSPG is not specifically required for CyPB/CD147 interaction but rather involved in the regulation of integrin activation and interaction with fibronectin. To validate this hypothesis, we analyzed the involvement of syndecan-1 and/or syndecan-2 in the capacity of  $CD4^+/CD45RO^+$  T cells to migrate in response to CyPB or RANTES (Figure 5B). Antibodies to syndecan-1 dramatically reduced migration of T cells induced by CyPB, confirming that inhibition of the association of CD147 to syndecan-1 core protein renders the cells unresponsive to CyPB. Conversely, the addition of anti-syndecan-2 antibodies had no inhibitory effect on the in vitro migratory responses induced by either CyPB or RANTES. Finally, we analyzed the effects of antibodies to syndecan-1 or syndecan-2 in CyPB-induced p44/p42 MAPK activation (Figure 5C). Incubation of  $CD4^+/CD45RO^+$  T cells with anti-syndecan-1 antibodies potently reduced CyPB-mediated ERK phosphorylation, while anti-syndecan-2 antibodies were ineffective, indicating that disruption of the association between syndecan-1 and CD147 led to neutralization of CyPB-mediated ERK activation. These data further support our hypothesis that syndecan-1 is specifically involved in the responses induced by CyPB, while syndecan-2 probably act as a regulator of cell adhesion to fibronectin.

#### *Effect of silencing syndecan-1 expression on CyPB-induced responses*

Finally, we used an RNA interference approach to confirm the involvement of syndecan-1 in CyPB-induced ERK activation and cell responses. To this end, we used THP-1 cells, which have been recently reported to be responsive to secreted cyclophilins (Kim et al. 2005). We first checked that CyPB bound to THP-1 cells and induced ERK phosphorylation, cell chemotaxis, and adhesion to fibronectin, by a mechanism dependent on the presence of CD147. The siRNA (small-interfering RNA) were then tested for their ability to suppress syndecan-1 or syndecan-2 specifically. Transfection of THP-1 cells with syndecan-1 siRNA resulted in a syndecan-1 mRNA down-regulation reaching 80% at day 2, by comparison with control cells. No significant decrease in the mRNA levels of syndecan-2 or other HSPG could be observed, confirming the specificity of the siRNA. Syndecan-2 siRNA was efficient to reduce syndecan-2 gene expression without affecting the levels of syndecan-1 or other HSPG (Figure 6A and data not shown). Moreover, cell immunostaining of CD147 was not modified, indicating that knockdown of syndecan-1 or syndecan-2 had no inhibitory effect on the expression of CD147 at the cell membrane (data not shown). We then analyzed the interaction between CyPB and cell-surface HS in transfected cells. As a control, we first checked that heparinase treatment





**Fig. 6.** Effect of syndecan-1 siRNA on CyPB-induced responses. Differentiated THP-1 cells were transfected with syndecan-1 siRNA, syndecan-2 siRNA, or GFP-siRNA (control). **(A)** The expression of specific RNA of syndecan-1 and syndecan-2 was analyzed by semi-quantitative RT-PCR 48 h post transfection. **(B)** Involvement of syndecan-1 and syndecan-2 in the interaction of CyPB with cell surface HS was analyzed by measuring the binding of transfected THP-1 cells (72 h posttransfection) to immobilized CyPB (1  $\mu$ g/well). Heparinase-treated cells were used as a control to estimate the whole participation of HS in the interaction. **(C)** THP-1 cells (72 h posttransfection) were either stimulated or not in the presence of 50 nM CyPB for various times and the activation of p44/p42 MAPK was analyzed by using anti-phosphorylated ERK1/2 (p-ERK). Parallel immunoblotting with anti-total ERKs confirmed equal loading of samples. **(D)** CyPB-mediated adhesion and migration of THP-1 cells were analyzed 72 h posttransfection. Left panel: migratory response of THP-1 cells transfected with syndecan-1 siRNA (filled bars), syndecan-2 siRNA (grey bars) or GFP-siRNA (open bars) to increasing concentrations of CyPB. Right panel: cell adhesion to fibronectin in the absence (filled bars) or the presence of 50 nM CyPB. Each bar of histograms represents mean  $\pm$  SD of triplicate. Representative results from three independent experiments are shown.

reduced CyPB binding by more than 85%. Surprisingly, CyPB binding was only reduced by 27 and 36% in both the cells transfected with syndecan-1 siRNA and syndecan-2 siRNA, respectively (Figure 6B). These data indicate that CyPB interacts with HS independently of the nature of the core protein of HSPG. However, it can be hypothesized that HS generally serve to concentrate CyPB in the neighborhood of responsive cells, while only the glycanic moieties of syndecan-1 are involved in the presentation of CyPB to CD147. When analyzing the intracellular events initiated by CyPB, we found, indeed, that syndecan-1 siRNA potentially reduced the level of

ERK phosphorylation. In contrast, knockdown of syndecan-2 was inefficient, further demonstrating that only syndecan-1 is required for inducing activation of p44/p42 MAPK pathway (Figure 6C). Finally, we tested the cell responses triggered by CyPB in transfected cells. As expected, CyPB-induced chemotaxis and cell adhesion were both reduced in THP-1 cells where syndecan-1 expression was down-regulated. Similar to the results obtained with anti-HSPG antibodies, syndecan-2 siRNA did not modify the chemotactic response to CyPB in THP-1 cells, while adhesion of transfected cells was potentially reduced by comparison with control (Figure 6D). Altogether, these data further demonstrated that syndecan-1 is involved in the molecular events initiated by CyPB binding to responsive cells, whereas syndecan-2 probably functions as a regulator of T-lymphocyte adhesion to fibronectin.

## Discussion

CD147 was demonstrated to be essential for cyclophilin-induced cellular responses (Yurchenko et al. 2001; Allain et al. 2002; Yurchenko et al. 2002; Arora et al. 2005). In the current study, we further demonstrated that CyPB-mediated enhanced adhesion of T cells is dependent on CD147 and ERK phosphorylation. However, direct binding of cyclophilins to CD147 has not been formally demonstrated, suggesting a mode of activation where CD147 might transmit signaling events through an unusual mechanism. Interestingly, Pro<sup>180</sup> and Gly<sup>181</sup> residues in the extracellular loop of CD147 were found to be critical for inducing signaling events (Yurchenko et al. 2002). Moreover, defective PPIase cyclophilin mutants failed to induce cell adhesion (Carpentier et al. 2002). We further demonstrated here that CyPB<sub>R62A</sub>, a mutant deprived of PPIase activity, failed to initiate ERK phosphorylation, indicating that activation of signaling pathway would be consequent on the conformational rearrangement of the polypeptide chain of CD147. Such a PPIase-dependent mechanism of regulation has already been demonstrated for the tyrosine kinase Itk. According to the *cis-trans* isomerization of an exposed peptide bond by CyPA, the kinase could interact with either a SH3 domain or more commonly with a phosphotyrosine (Brazin et al. 2002).

CD147 is broadly expressed on hemopoietic and nonhemopoietic cells lines. It was initially identified on the surface of human cancer cells and has been proven to stimulate adjacent stromal cells to produce several matrix metalloproteinases. It is also involved in intercellular adhesion, via homophilic interaction (Guo et al. 1997; Sun and Hemler 2001; Toole 2003). Most CD147-expressing cells are, however, not responsive to secreted cyclophilins. Therefore, our previous findings that secreted CyPB binds to the membrane of responsive cells with high affinity have raised the possibility that CD147 is only a signaling molecule, which has to be associated to a binding subunit to form a fully active cyclophilin receptor. The present results strongly support this hypothesis. We demonstrated that CD147 is partially associated to syndecan-1 even in the absence of ligand. Binding of CyPB to the HS moieties of syndecan-1 induced an increase in the association between syndecan-1 and CD147, which probably led to initiation of signaling events and consequent cellular responses. Indeed, knockdown of syndecan-1 by siRNA or dissociation of the heterocomplex by anti-syndecan-1 antibodies

potently reduced CyPB-induced ERK phosphorylation and subsequent chemotaxis and adhesion of responsive cells. These results support the model, in which binding to syndecan-1 is required to stably present CyPB to CD147 expressed on responsive cells.

Removal of cell surface HS by heparinase I treatment abolished CyPA-mediated signaling and chemotactic activity, indicating that the cell responses triggered by CyPA are also dependent on the presence of HSPG (Yurchenko et al. 2002). A mutant of CyPB in which <sup>3</sup>KKK<sup>5</sup> sequence was replaced by <sup>3</sup>AAA<sup>5</sup> did not increase T-cell adhesion to fibronectin but did induce reduced signaling and chemotactic responses, thus mimicking behavior of CyPA (Allain et al. 2002; Carpentier et al. 2002). One explanation for this discrepancy may be related to the affinity of both cyclophilins to cell surface HS. Indeed, the high-affinity interaction between CyPB and HS probably results in a more stable binding and may explain why CyPB is a more potent agonist than CyPA. Therefore, high-affinity binding of CyPB to HS moieties of syndecan-1 probably induces potent signaling events related to integrin-mediated adhesion of T cells, whereas low-affinity interaction of CyPA with the same HSPG is likely to be sufficient to initiate chemotaxis. Altogether, these data suggest that syndecan-1 could serve as the binding subunit to form the fully active receptor for both secreted CyPA and CyPB.

Surprisingly, we found that incubation of CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes with antibodies to syndecan-2 or knockdown of syndecan-2 by siRNA significantly inhibited cell adhesion to fibronectin, without modifying either ERK phosphorylation or cell migration. However, we found that anti-syndecan-2 antibodies also influenced RANTES-induced cell adhesion, thus suggesting that syndecan-2 is involved in the regulation of integrin-mediated cell adhesion to fibronectin rather than in CyPB-mediated signaling. These results are consistent with the findings demonstrating that syndecan-2 acts cooperatively with  $\beta$ 1 integrins to regulate cell adhesion, focal adhesion assembly, and stress fiber organization (Itano et al. 1996; Kusano et al. 2000; Munesue et al. 2002), indicating that this HSPG is generally involved in the regulation of cell adhesion.

The demonstration that syndecans are involved in the responses induced by extracellular biologically active factor is not unprecedented. These HSPG contain a conserved motif through which they interact with regulatory proteins involved in organizing complexes at the plasma membrane and recruiting signaling proteins from the cytosol, suggesting that they participate in the modulation of intracellular events related to cell adhesion, growth, and differentiation (Woods and Couchman 2001). As examples, syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor (HGF) binding and promotes Met signaling in multiple myeloma cells (Derksen et al. 2002). Most recently, syndecan-1 was demonstrated to be involved in the migration of peripheral blood monocytes induced by osteopontin, a protein that regulates differentiation and activation of osteoclasts (Mosheimer et al. 2005). Syndecan-4 interacts with protein kinase C- $\alpha$  and PIP2 and plays a key role in the modulation of the responses initiated by basic fibroblast growth factor (FGF-2) and antithrombin III, for which it serves as a binding site and an intermediate molecule in signaling events (Volk et al. 1999; Kaneider et al. 2002). Interestingly, syndecan-4 from SDF-1/CXCL12 activated cells physically

associates to CXCR4 and is required for p44/p42 MAPK activation, suggesting that the responses initiated by the chemokine is also dependent on the formation of a fully active syndecan/signaling receptor heterocomplex (Charnaux et al. 2005). In agreement with these data, the results presented here provide a novel example on the requirement of a member of the syndecan family in efficient binding of an extracellular biologically active factor to signaling receptor and initiation of cellular responses.

The presence of elevated levels of extracellular cyclophilins has been reported in several inflammatory diseases (Billich et al. 1997; Tegeder et al. 1997; Jin et al. 2000). In the case of rheumatoid arthritis, levels of CyPA within synovial fluid of patients were found to directly correlate with disease severity (Billich et al. 1997). Cartilage chondrocytes were shown to secrete CyPB in response to matrix metalloproteinases, providing an additional source of cyclophilins released during ongoing disease (De Ceuninck et al. 2003). Finally, Zhu et al. (2005) found increased expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis and demonstrated that anti-CD147 antibodies or CD147 antagonistic peptides blocked migration to synovial fluids. Taken together, these data suggest an important contribution of CD147-cyclophilin interaction in inflammatory diseases. In addition to their involvement in inflammation, secreted cyclophilins have been implicated in the physiopathology of HIV-1. CyPA interaction with CD147 and syndecans has been demonstrated to play a role in HIV-1 infection and to contribute to AIDS pathogenesis (Saphire et al. 1999; Pushkarsky et al. 2001; Saphire et al. 2001). These data suggest two non-mutually exclusive mechanisms for explaining the activity of CyPA. By interacting with HS, CyPA might promote attachment of the virions to target cells and/or by interacting with CD147, could regulate viral entry. Our current findings suggest that binding to HS moieties of syndecan-1 might in fact facilitate subsequent interaction with CD147. Therefore, the signaling responses initiated by CD147/syndecan-1 engagement might contribute to HIV-induced cell activation, which is one of the crucial factors in AIDS pathogenesis.

Detailed analysis of the interaction of cyclophilins with CD147 and HS and characterization of the signaling pathways mediating cyclophilin activities would then provide an opportunity to manipulate inflammatory responses and to treat pathogenic conditions that depend on cyclophilins. In this context, the findings that HS bind and modulate the activity of secreted cyclophilins offer the opportunity to develop molecular mimetics with therapeutic applications to antagonize pathogenic interaction of cyclophilin with CD147.

## Materials and methods

### *Antibodies and reagents*

Recombinant human CyPB was produced and purified as described (Spik et al. 1991). The mutant CyPB<sub>R62A</sub> was engineered by site-directed mutagenesis and purified as described (Carpentier et al. 1999). This mutant was unable to promote adhesion of T cells, even though it retained the capability to interact with cell surface binding sites (Carpentier et al. 2002). Human fibronectin was a gift from Dr P. Delannoy (University of Lille, France). Cell surface HSPG were

extracted and enriched by anion exchange chromatography on DEAE-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont Buckinghamshire, UK), as described (Vanpouille et al. 2004). Rabbit polyclonal antibodies to CyPB were produced at home. Antibodies to human CD3 (X35), CD4 (13B.8.2), CD8 (B9.11), CD14 (RMO52), CD20 (B9E9), CD45RA (ALB11), CD45RO (UCHL1), and CD56 (T199) were purchased from Beckman Coulter (Fullerton, CA). Mouse monoclonal antibodies to CD147 (clone HIM6) were from BD Pharmingen (San Diego, CA). Goat polyclonal antibodies to human syndecan-1 (C-20), syndecan-2 (L-18), syndecan-4 (N-19), betaglycan (C-20), glypican-1 (S-16), rabbit polyclonal antibodies to syndecan-2 (M-140) and phospho-p38-MAPK (Tyr-182), mouse monoclonal antibodies to syndecan-1 (DL-101), syndecan-4 (5-G9), phospho-ERK1/2 (E-4), and JNK (D2) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Rabbit polyclonal antibodies to CD44v3 variant (AB2081) and mouse monoclonal anti-HS (MAB2040) were from Chemicon Int. (Temecula, CA). Rabbit polyclonal anti-phospho-JNK and mouse monoclonal anti-p38-MAPK (2F11) were from Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY). Rabbit polyclonal anti-ERK1/2, fluorescein-conjugated antibodies to mouse, rabbit, goat IgG or mouse IgM, horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG or anti-mouse IgM, and isotype-matched control antibodies were from Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies were from Amersham Pharmacia Biotech. RANTES/CCL5, heparinase I (EC 4.2.2.7), chondroitinase ABC (EC 4.2.2.4), and phosphatidyl-inositol phospholipase C (EC 3.1.4.10) were obtained from Sigma. PD98059 was from Calbiochem (La Jolla, CA). Cell culture products were from Life Technologies (Paisley, Scotland, UK). Oligonucleotide primers and siRNA sequences were synthesized and purified by Eurogentec (Seraing, Belgium). All other chemicals, except where otherwise mentioned, were purchased from Sigma.

#### *Isolation of T lymphocytes and cell culture*

Human citrated venous blood samples from healthy donors were obtained from the Etablissement Français du Sang (Lille, France). Peripheral blood CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes were isolated by exhaustive negative selection (Allain et al. 2002). Purity of the T-cell population was assessed by flow cytometry and found more than 95%. Heparinase-treated T lymphocytes were obtained by incubating cells with 0.75 unit of heparinase I/10<sup>6</sup> cells for 2 h at 37 °C. Human promonocytic leukemia THP-1 cells (88081201; ECACC, Porton Down, Salisbury, UK) were routinely cultured in RPMI 1640 containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 20 μM β-mercaptoethanol, 10 mM gentamycin in 5% CO<sub>2</sub> enriched atmosphere at 37 °C. To induce responsiveness to CyPB, THP-1 cells were differentiated for 72 h with 50 nM 1,25-dihydroxy-vitamine D3 (Vey et al. 1992). Efficacy of the treatment was checked by analyzing CD14 expression by flow cytometry and found more than 90%.

#### *Flow cytometry analysis*

Analysis of the expression of CD markers was performed by incubating either peripheral blood T lymphocytes or THP-1

cells (5 × 10<sup>5</sup> cells per sample) in Dulbecco's phosphate buffered saline containing 0.5% bovine serum albumin (DPBS/BSA) supplemented with the appropriate monoclonal antibodies or the respective isotype-matched control IgG for 1 h at 4 °C (Denys et al. 1997). After washing, cells were labeled for 1 h at 4 °C with fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG (1/64). For the detection of HSPG, T cells were fixed for 30 min at 4 °C with 3% formaldehyde, pH 7.8 and treated with 0.1% saponin in DPBS/BSA supplemented with 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) prior the addition of primary antibodies. Thereafter, T cells were incubated in the same buffer with goat polyclonal anti-syndecan-1, -2, -4 (1/100), goat polyclonal anti-betaglycan (1/100), rabbit polyclonal anti-CD44v3 (1/500), mouse monoclonal anti-HS (1/100), or the respective control antibodies (1/2000) for 1 h at 4 °C. After washing, appropriate fluorescein-conjugated secondary antibodies were added for another 1 h-incubation. Cells were washed twice and immediately used for analysis. Data were monitored on a Becton Dickinson flow cytometer (FACScalibur) (Mountain View, CA) and analyzed with CellQuest software.

#### *Western blot analysis*

Cells (4 × 10<sup>6</sup> per sample) were washed in cold PBS and lysed in 100 μL of lysis buffer (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 20% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, and 10 mM sodium fluoride) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche, Meylan, France) for 3 h at 4 °C. The lysates were clarified by centrifugation at 10 000g for 30 min at 4 °C. Proteins were then separated on 10% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes (Sartorius, Göttingen, Germany). Blots were blocked for 1 h at room temperature in 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, and 1 mM EDTA, 0.1% Tween-20, pH 7.6 [Tris-buffered saline (TBS)–Tween], supplemented with 3% BSA. Membranes were then incubated for 2 h at room temperature with the appropriate primary antibodies in TBS-Tween supplemented with 1% BSA. After extensive washing with TBS-Tween, immunoblotted proteins were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1 h-incubation, 1/5000) by using a chemiluminescence detection kit (ECL) (Amersham, Little Chalfont Buckinghamshire, England).

#### *Electrophoretic mobility shift assay of HSPG*

Cells (100 × 10<sup>6</sup> per mL) were washed in cold PBS and lysed in 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 containing 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail, overnight at 4 °C. The lysates were then clarified by centrifugation at 10 000g for 30 min at 4 °C and samples (70 μL) were incubated for 1 h at 4 °C in the absence or presence of antibodies immunoreactive to HSPG or CD147 (0.2 μg per sample). Thereafter, the samples were supplemented with 10 μL of 60% glycerol and subjected to electrophoresis on a 10% (w/v) native polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories) in 40 mM TRIS/acetate, 1 mM EDTA, pH 7.8. A mixture of bromophenol blue was used as electrophoresis marker. After electrophoresis, the gel was incubated overnight in a 10 mM TRIS/HCl buffer, pH 7.4, containing 1% SDS and the proteins were transferred onto

nitrocellulose. To check the position of HSPG-antibody complexes, the membrane was either directly immunostained with appropriate peroxidase-conjugated antibodies or used for a two-step immunostaining procedure, as described earlier. In the last case, primary antibodies were of different origin in order to avoid cross-reaction with the antibodies used for EMSA.

#### *Semi-quantitative RT-PCR*

Total RNA was extracted from  $5 \times 10^6$  cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Hœrdt, France). Reverse transcription was performed from 2  $\mu$ g of total RNA with an oligo-dT primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). The PCR reactions were carried out using Readymix RedTaq PCR reaction mix. The synthetic primers for syndecan-2, CD44v3 and betaglycan were obtained from published data (Deng et al. 1999; Jones et al. 2000; Modrowski et al. 2000). The following primers for syndecan-1, -3, -4 and glypican-1 were designed according to the published cDNA sequences (accession numbers: NM\_002997, NM\_014654, NM\_002999 and NM\_002081, respectively). The primer sets for PCR and the size of the expected amplification products were as follows: syndecan-1, 5'- CCC CGT TTC TGG TGG TCT- 3' (sense) and 5'- TGT CTG AAG GCT GAG TCC C -3' (antisense), product size 175 bp; syndecan-3, 5'-CTG GAC AAT GCC ATC GAC TCG-3' (sense) and 5' -CTT CTG GTA TGT GAC GCT CGC -3' (antisense), product size 219 bp; syndecan-4, 5'-GCT GCT GCT GTT CTT CGT -3' (sense) and 5'- ACA ACT TCA GGG CCG ATC- 3' (antisense), product size 213 bp; glypican-1, 5'- TGG TGG CTG CTA TGT GCG -3' (sense) and 5'- TCC GCT CCG AGT CGT TCA-3' (antisense), product size 340 bp. Optimum semi-quantitative PCR conditions were established to remain in the exponential phase of amplification. The following conditions were retained: 30 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 74 °C for 1 min. The housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was amplified in each sample to normalize for total mRNA input and confirm efficiency of cDNA synthesis. The amplification products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel containing ethidium bromide and analyzed. Images were acquired with the Gel Doc 2000 Image analysis apparatus and analyzed with the supplied software Quantity-One (Bio-Rad, Richmond, CA). The sequence of each amplified product was confirmed by sequencing (Genoscreen, Lille, France).

#### *RNA interference*

Synthetic syndecan siRNA duplexes with symmetric 3'-deoxythymidine overhangs were chemically synthesized, purified by electrophoresis and annealed before use. The sequences used to inhibit mRNA expression of syndecan-1 and syndecan-2 were: 5'-GCA GGA CUU CAC CUU UGA ATT-3', (nucleotides 923-941, geneBank Accession Number NM\_002997), and 5'-CCA CGA CGC UGA AUA UAC ATT-3' (nucleotides 881-899, geneBank Accession Number NM\_002998), respectively. The oligonucleotide sequences were subjected to a basic local alignment search tool (BLAST) search analysis and no significant identity to other sequences could be detected. To check the sequence specificity of the RNA interference, a

double-strand siRNA corresponding to the sequence 5'-GAA CGG CAU CAA GGU GAA CTT-3' of GFP (Green Fluorescent Protein) was used as a negative control. THP-1 cells were transfected with 2  $\mu$ g of siRNA duplexes in serum-free medium using DreamFect reagent (OZ-Biosciences, Marseille, France), according to the manufacturer's instructions. Efficiency of RNA interference was assessed in analyzing the respective expressions of mRNA from syndecan-1 and syndecan-2. The cell responsiveness to CyPB was analyzed 72 h posttransfection.

#### *Cell adhesion and migration assays*

In vitro chemotaxis was assayed in microchemotaxis chamber containing either 8  $\mu$ m pore polycarbonate membrane for THP-1 cells or 5  $\mu$ m pore polycarbonate membrane for T lymphocytes (Corning Costar Corp., Cambridge, MA), as described in Allain *et al.* (2002). Adhesion assays were performed in 96-well microtiter plates coated with fibronectin (1  $\mu$ g per well), as described (Allain *et al.* 2002). Routinely, T lymphocytes ( $10 \times 10^6$  per mL) or THP-1 cells ( $7.5 \times 10^6$  per mL) were preincubated in DPBS/BSA with the appropriate agonist (CyPB, CyPB<sub>R62A</sub> or RANTES) for 10 min at 37 °C and the mixture was then distributed into the wells (100  $\mu$ L) for an additional 20 min incubation at 37 °C. In time-course experiments, T cells were mixed with 50 nM CyPB and directly added to the fibronectin-coated plates for varying times. Thereafter, the plates were washed with DPBS and the remaining firmly attached cells were fixed with 3% formaldehyde, stained with 1% methylene blue and lysed with HCl 0.1 N. The absorbance was measured at 590 nm with a microplate BioRad reader Model 550 (Hercules, CA). Cell adhesion was estimated by using standard curves where absorbances were related to cell numbers, and results were expressed as a percentage of the initially added cells remaining fixed to the substrate. In some experiments, cells were pretreated for 1 h at 37 °C with 50  $\mu$ M PD98059 or preincubated for 1 h at 20 °C in the presence of antibodies to cell surface HSPG (2  $\mu$ g/mL) or to CD147 (10  $\mu$ g/mL), and thereafter used for adhesion or migration assays. Neutralizing antibodies were checked for their inability to induce cell responses in the absence of agonist. Interaction between CyPB and cell-surface HS was determined as described (Carpentier *et al.* 2002).

#### *Statistical analysis*

Results are representative of at least three independent experiments conducted with either peripheral blood CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes from different donors or differentiated THP-1 cells. Statistical significance between the different values was analyzed by Student's *t*-test with a threshold of  $P < 0.05$ .

#### **Acknowledgments**

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

#### **Conflict of interest statement**

None declared.

## Abbreviations

BLAST, basic local alignment search tool; BSA, bovine serum albumin; CS, chondroitin sulphate; CsA, cyclosporine A; CyPA, cyclophilin A; CyPB, cyclophilin B; DPBS, Dulbecco' phosphate buffered saline; EDTA, ethylenediamine tetra-acetic acid; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GAG, glycosaminoglycan; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HS, heparan sulphate; HSPG, HS proteoglycan; JNK, Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PPLase, peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulphate; siRNA, small interfering RNA; TBS, Tris-buffered saline.

## References

- Allain F, Vanpouille C, Carpentier M, Slomianny M-C, Durieux S, Spik G. 2002. Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2714–2719.
- Arora K, Gwinn WM, Bower MA, Watson A, Okwumabua I, MacDonald HR, Bukrinsky MI, and Constant SI. 2005. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol*. 175:517–522.
- Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*. 68:729–777.
- Billich A, Winkler G, Aschauer H, Rot A, Peichl P. 1997. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 185:975–980.
- Brazin KN, Mallis RJ, Fulton DB, Andreotti AH. 2002. Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:1899–1904.
- Carpentier M, Allain F, Haendler B, Denys A, Mariller C, Benaïssa M, Spik G. 1999. Two distinct regions of cyclophilin B are involved in the recognition of a functional receptor and of glycosaminoglycans on T lymphocytes. *J Biol Chem*. 274:10990–10998.
- Carpentier M, Allain F, Slomianny MC, Durieux S, Vanpouille C, Haendler B, 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.
- Charnaux N, Brule S, Hamon M, Chaigneau T, Saffar L, Prost C, Lievre N, Gattegno L. 2005. Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12. *FEBS Lett*. 272:1937–1951.
- Delehedde M, Allain F, Payne SJ, Borgo R, Vanpouille C, Fernig DG, Deudon E. 2002. Proteoglycans in inflammation. *Curr Med Chem*. 1:89–102.
- De Ceuninck F, Allain F, Caliez A, Spik G, Vanhoutte PM. 2003. High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans, and its release from the cell surface by metalloproteinases. *Arthritis Rheum*. 48:2197–2206.
- Deng X, Bellis S, Yan Z, Friedman E. 1999. Differential responsiveness to autocrine and exogenous transforming growth factor (TGF). beta1 in cells with nonfunctional TGF-beta receptor type III. *Cell Growth Differ*. 10:11–18.
- Denys A, Allain F, Foxwel B, Spik G. 1997. Distribution of cyclophilin B-binding sites in the subsets of human peripheral blood lymphocytes. *Immunology*. 91:609–617.
- Derksen PW, Keehnen RM, Evers LM, van Oers MH, Spaargaren M, Pals ST. 2002. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood*. 99:1405–1410.
- Drzeniek Z, Siebertz B, Stöcker G, Just U, Ostertag W, Greiling H, Haubeck H-D. 1997. Proteoglycan synthesis in haematopoietic cells: isolation and characterization of heparan sulphate proteoglycans expressed by the bone-marrow stromal cell line MS-5. *Biochem J*. 327:473–480.
- Endrich MM, 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.
- Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. 1989. Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature*. 337:476–478.
- 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.
- Gonzalez-Cuadrado S, Bustos C, Ruiz-Ortega M, Ortiz A, Guizarro C, Plaza JJ, 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.
- Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biwas C. 1997. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 272:24–27.
- Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. 1984. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*. 226:544–547.
- Ilangumaran S, Borisch B, Hoessli DC. 1999. Signal transduction *via* CD44: role of plasma membrane microdomains. *Leuk Lymphoma*. 35:455–469.
- Itano N, Oguri K, Nagayasu N, Kusano Y, Nakanishi H, David G, Okayama M. 1996. Phosphorylation of a membrane-intercalated proteoglycan, syndecan-2, expressed in a stroma-inducing clone from a mouse Lewis lung carcinoma. *Biochem J*. 315:925–930.
- Jackson DG, Bell JI, Dickinson R, Timans J, Shields J, Whittle NP. 1995. Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. *J Cell Biol*. 128:673–685.
- Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendler J, Suh YA, Lambeth JD, Berk BC. 2000. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res*. 87:789–796.
- Jones M, Tussey L, Athanasou N, Jackson DG. 2000. Heparan sulfate proteoglycan isoforms of the CD44 hyaluronan receptor induced in human inflammatory macrophages can function as paracrine regulators of fibroblast growth factor action. *J Biol Chem*. 17:7964–74.
- Kaneider NC, Reinisch CM, Duzendorfer S, Romisch J, Wiederman CJ. 2002. Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J Cell Sci*. 115:227–236.
- Kim H, Kim W-J, Jeon S-T, Koh E-M, Cha H-S, Ahn K-S, Lee W-H. 2005. Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clin Immunol*. 116:217–224.
- Kusano Y, Oguri K, Nagayasu Y, Munesue S, Ishihara M, Saiki I, Yonekura H, Yamamoto H, Okayama M. 2000. Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Exp Cell Res*. 256:434–444.
- Kuschert GS, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogwerf AJ, Wells TN. 1999. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry*. 38:12959–12968.
- Modrowski D, Basle M, Lomri A, Marie PJ. 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.
- Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani AM, Sturm DH, Patsch JR, Wiedermann CJ. 2005. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 90:2964–2971.
- Munesue S, Kusano Y, Oguri K, Itano N, Yoshitomi Y, Nakanishi H, Yamashina I, Okayama M. 2002. The role of syndecan-2 in regulation of actin-cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma-derived metastatic clones. *Biochem J*. 363:201–209.
- Pushkarsky T, Zybarth G, Dubrovsky L, Yurchenko V, Tang H, Guo H, Toole B, Sherry B, Bukrinsky M. 2001. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:6360–6365.
- Rapraeger AC, Ott VL. 1998. Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 10:620–628.
- Roscic-Mrkic B, Fischer M, Leeman C, Manrique A, Gordon CJ, Moore JP, Proudfoot AE, Trkola A. 2003. RANTES (CCL5) uses the proteoglycan

- CD44 as an auxiliary receptor to mediate cellular activation signals and HIV-1 enhancement. *Blood*. 102:1169–1177.
- Saphire AC, Bobardt MD, Gally PA. 1999. Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells *via* heparans. *EMBO J*. 18:6771–6785.
- Saphire AC, Bobardt MD, Zhang Z, David G, Gally PA. 2001. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol*. 75:9187–9200.
- Schreiber SL. 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*. 251:283–287.
- Selleck SB. 2000. Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet*. 16:206–212.
- Sherry B, Yarlet N, Strup A, Cerami A. 1992. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:3511–3515.
- Spik G, Haendler B, Delmas O, Mariller C, Chamoux M, Maes P, Tartar A, Montreuil J, Stedman K, Kocher HP et al., 1991. A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J Biol Chem*. 266:10735–10738.
- Sun J, Hemler ME. 2001. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*. 61:2276–2281.
- Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. 1989. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*. 337:473–475.
- Tanaka Y, Adams DH, Shaw S. 1993. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* 14: 111–115.
- Tegeder I, Schumacher A, John S, Geiger H, Geisslinger G, Bang H, Brune K. 1997. Elevated serum cyclophilins levels in patients with severe sepsis. *J Clinical Immunol*. 17:380–386.
- Toole BP. 2003. Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. *Curr Top Dev Biol*. 54:371–389.
- Vanpouille C, Denys A, Carpentier M, Pakula R, Mazurier J, Allain F. 2004. Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of cyclophilin B to heparin and heparan sulfates. *Biochem J*. 382:733–740.
- Vey E, Zhang JH, Dayer JM. 1992. IFN-gamma and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induce on THP-1 cells distinct patterns of cell surface antigen expression, cytokine production, responsiveness to contact with activated T cells. *J Immunol*. 15:2040–2046.
- Volk R, Schwartz JJ, Li J, Rosenberg RD, Simons M. 1999. The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem*. 274:24417–24424.
- Woods A, Couchman JR. 2001. Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr Opin Cell Biol*. 13:578–583.
- Xu Q, Leiva MC, Fischkoff SA, Handschumacher RE, Lyttle CR. 1992. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem*. 267: 11968–11971.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 64:841–848.
- Yurchenko V, O'Connor M, Dai WW, Guo H, Toole B, Sherry B, Bukrinsky M. 2001. CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem Biophys Res Commun*. 288:786–788.
- Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, Dai WW, Franchin G, Hao T, Guo H, Hung HC, Toole B, Gally P, Sherry B, Bukrinsky M. 2002. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity *via* CD147. *J Biol Chem*. 277:22959–22965.
- Zhu P, Ding J, Zhou J, Dong WJ, Fan CM, Chen ZN. 2005. Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production. *Arthritis Res Ther*. 7, 1023–1033.

L'activité des protéoglycanes membranaires est dépendante de l'interaction entre les chaînes HS et des médiateurs extracellulaires. Toutefois, cette activité se manifeste selon deux modèles : soit le protéoglycane ne sert qu'à présenter le ligand au récepteur ; soit sa partie intracellulaire participe également à l'activation de voies de signalisation en coopération avec le récepteur protéique.

De plus en plus d'exemples dans la littérature relatent la participation des cores protéiques des protéoglycanes dans les activités des médiateurs solubles; le syndécan-4 et le FGF ou encore le SDF-1, le syndécan-1 et le HGF ou encore le CD44v3 et RANTES (Derksen *et al.*, 2002 ; Hamon *et al.*, 2004 ; Volk *et al.*, 1999 ; Roscic-Mrkic *et al.*, 2003). Dans le cas de la CyPB, l'élimination des chaînes HS inhibe l'activation de la voie p44/p42 MAPK ainsi que l'adhérence cellulaire à la fibronectine. L'ajout de chaînes HS libres ou une forte concentration en CyPB ne restaurent pas ces activités. Ces données démontrent que les protéoglycanes jouent un rôle de co-récepteur. Il est alors apparu essentiel d'identifier le protéoglycane impliqué.

Alors que les lymphocytes T expriment différents HSPG ; les syndécan-1, -2 et -4 ; le CD44v3 et le bétaglycan, seul le syndécan-1 est impliqué dans l'activation de la voie p44/p42 MAPK et l'adhérence cellulaire induites par la CyPB. La technique de retard sur gel appliqué aux HSPG a permis de mettre en évidence l'association entre le syndécan-1 et le CD147 même en l'absence de ligand. Cette constatation peut paraître étonnante, mais une telle association a déjà été décrite pour le CXCR4 et le syndécan-4 (Charnaux *et al.*, 2005). Le complexe syndécan-1/CD147 pré-existe à la surface des cellules, mais la fixation du ligand induit son augmentation et/ou sa stabilisation, suggérant que la liaison de la CyPB induit des modifications transitoires et dynamiques. Le rôle de ce complexe a été confirmé par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les cores protéiques des HSPG. Un anticorps anti-syndécan-1 dirigé contre un épitope extracellulaire inhibe l'adhérence induite par la CyPB. Toutefois, un résultat similaire a été obtenu avec un anticorps anti-syndécan-2. Par ailleurs, l'activité pro-adhésive de la chimiokine RANTES est également inhibée par cet anticorps anti-syndécan-2, alors qu'aucun effet n'est constaté avec l'anticorps anti-syndécan-1. Par comparaison avec les résultats obtenus avec la CyPB, on peut conclure que le syndécan-2 est impliqué dans des phénomènes d'adhérence et que les résultats obtenus avec cet anticorps ne sont pas spécifiques de la CyPB. La participation du syndécan-2 dans les phénomènes d'adhérence n'est pas étonnant. Bien que les travaux sur les syndécans mettent plus en lumière le rôle du syndécan-4 dans les phénomènes d'adhérence, le syndécan-2 a été

récemment impliqué dans les mêmes activités (Itano *et al.*, 1996 ; Kusano *et al.*, 2000 ; Munusue *et al.*, 2002).

De façon à confirmer la participation du syndécan-1 dans les activités de la CyPB, nous avons utilisé la méthode de l'ARN interférence sur les cellules THP1 différenciées en macrophages. Ces cellules répondent à la CyPB de la même façon que les lymphocytes T et sont plus facilement utilisables pour ce type d'expériences. Seul le siRNA dirigé contre le syndécan-1 inhibe les réponses induites par la CyPB, démontrant l'importance du core protéique de ce protéoglycane dans la signalisation induite par la CyPB.

## II. Etude de l'interaction entre les chaînes HS et la CyPB

Les travaux réalisés sur les chaînes HS ont démontré qu'elles contenaient des motifs spécifiques décrits pour réguler la fixation et l'activité de certaines HBPs. La taille minimale du motif nécessaire à la fixation des HBPs n'est pas le seul critère, la structure des HS est très complexe à cause des modifications imposées par les enzymes de biosynthèse qui modulent le niveau de sulfatation de la chaîne. Certains motifs ont été identifiés précisément comme celui du FGF-2, de l'anti-thrombine ou de la protéine gD de l'HSV-1. Par exemple, le pentasaccharide fixant l'anti-thrombine III contient un groupement 3-O-sulfate sur le résidu de glucosamine N-sulfatée central essentiel à l'activité anti-coagulante de la protéine (Petitou *et al.*, 2003). Alors que pour la protéine gD, il s'agit d'un octasaccharide contenant un motif rare contenant une glucosamine NH<sub>2</sub> libre 3-O sulfatée [IdoA2S-GlcNH<sub>2</sub>3S<sup>+/-</sup>6S] (Shukla *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2002).

Bien qu'exprimant les HSPG, certaines cellules comme les monocytes, les lymphocytes B et les cellules endothéliales sont incapables de fixer la CyPB avec une affinité comparable à celle des lymphocytes T, ce qui suggère une spécificité de reconnaissance entre les chaînes HS et la protéine. De façon à étudier le motif reconnu, des expériences d'interaction entre la CyPB et des oligosaccharides dérivés d'héparine ont été entreprises en utilisant un biosenseur de type Iasys. Ces travaux ont montré que le niveau de sulfatation et la présence de glucosamine NH<sub>2</sub> non substituée sont nécessaires à la fixation de la CyPB. Ces glucosamines libres sont des modifications rares qui ne représentent que 1,5 à 7% des glucosamines totales. Elles sont décrites pour leur rôle dans le recyclage des glypicans et la spécificité de liaison de la L-sélectine ou de la protéine gD de l'HSV-1. Toutefois, le mécanisme à l'origine de leur formation reste encore à élucider. L'activité de N-sulfatases ou de N-déacétylases spécifiques encore inconnues pourrait expliquer l'apparition de ces



glucosamines. Par ailleurs, l'activité déacétylase de la NDST-3 est plus importante que son activité N-sulfotransférase, suggérant l'implication de cette enzyme de biosynthèse dans la génération de ces motifs (Aikawa *et al.*, 2001).

Ces informations sur le motif ont été confirmées par la technique du retard sur gel en utilisant des oligosaccharides modifiés ou traités à l'acide nitreux. Cet agent chimique a permis de montrer qu'une glucosamine NH<sub>2</sub> libre, 3-O-sulfatée en position 2 de l'extrémité non réductrice précédée d'un acide iduronique 2-O-sulfaté est nécessaire à la fixation de la CyPB. La 3-O-sulfatation est dépendante de l'activité des 3-O-sulfotransférases qui sont au nombre de 7 isoformes, exprimées à différents taux selon les tissus. Nous avons voulu déterminer l'isoforme impliquée dans la sulfatation de ce résidu de glucosamine. Le profil d'expression des isoformes a été étudié dans différentes lignées cellulaires. Les cellules répondant à la CyPB expriment la 3-OST-3B seule ou en combinaison avec la 3-OST-3A. L'utilisation de siRNA dirigé contre ces enzymes a confirmé que la 3-O-sulfatation est essentielle à la fixation spécifique de la CyPB sur les cellules et à l'activation de voies de signalisation. En outre, il a été démontré que les 3-OST-3 sulfatent des glucosamines NH<sub>2</sub> non substituées. Ainsi, le motif déterminé serait un octasaccharide commençant par le disaccharide IdoUA2S-GlcNH<sub>2</sub>-3S ± 6S. Une telle séquence a déjà été caractérisée comme la signature du motif reconnu par la protéine gD de l'HSV-1, ce qui suggère que le virus utilise le motif naturel de la CyPB à son profit pour entrer dans la cellule.

Ces techniques ont permis de démontrer que la CyPB se fixait spécifiquement sur un octasaccharide comprenant une glucosamine NH<sub>2</sub> libre, 3-O-sulfatée en position 2 de l'extrémité non réductrice. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *J. Biol. Chem.* présentée en annexe: « The Heparin/Heparan Sulfate Sequence That Interacts with Cyclophilin B Contains a 3-O-Sulfated N-Unsubstituted Glucosamine Residue ».

L'importance du CD147 dans les activités des cyclophilines a été largement démontrée. La proline 180 et l'activité PPIase sont essentielles, suggérant que l'activation du CD147 passe par l'isomérisation de la liaison prolyle. De façon à approfondir notre connaissance sur la relation entre la chaîne héparane sulfate, la proline 180 du CD147 et la CyPB, nous avons réalisé des expériences de RMN dans le but de modéliser les interactions entre ces différents partenaires. Ces résultats ont conduit à la publication d'un article dans *J. Biol. Chem.*: « Structural and Functional characterisation of the Interaction between Cyclophilin B and an Heparin Derived Oligosaccharide ».

## STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF THE INTERACTION BETWEEN CYCLOPHILIN B AND A HEPARIN DERIVED OLIGOSACCHARIDE

Xavier Hanouille, Aurélie Melchior, Nathalie Sibille, Benjamin Parent, Agnès Denys, Jean-Michel Wieruszkeski, Dragos Horvath, Fabrice Allain, Guy Lippens & Isabelle Landrieu

From the Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR8576 CNRS – University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Running title: Molecular characterisation of heparan sulphate binding on CypB

Address correspondence to: Guy Lippens or Isabelle Landrieu, Unité de glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, IFR 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France, Tel. +33 (0)3 20 33 72 41 ; Fax. +33 (0)3 20 43 65 55 ; E-Mail : [guy.lippens@univ-lille1.fr](mailto:guy.lippens@univ-lille1.fr) or [isabelle.landrieu@univ-lille1.fr](mailto:isabelle.landrieu@univ-lille1.fr)

The chemotaxis and integrin-mediated adhesion of T lymphocytes triggered by secreted cyclophilin B (CypB) depend on interactions with both cell surface heparan sulphate proteoglycans (HSPG) and the extracellular domain of the CD147 membrane receptor. Here, we use NMR spectroscopy to characterize the interaction of CypB with heparin-derived oligosaccharides. Chemical shift perturbation experiments allowed the precise definition of the heparan sulphate (HS) binding site of CypB. The N-terminal extremity of CypB, which contains a consensus sequence for heparin-binding proteins was modelled on the basis of our experimental NMR data. Because the HS binding site extends towards the CypB catalytic pocket, we measured its PPIase activity in the absence or presence of a HS oligosaccharide toward a CD147-derived peptide. We report the first direct evidence that CypB is enzymatically active on CD147, as it is able to accelerate the *cis-trans* isomerisation of the Asp<sup>179</sup>-Pro<sup>180</sup> bond in a CD147-derived peptide. However, HS binding has no significant influence on this PPIase activity. We thus conclude that the glycanic moiety of HSPG serves as anchor for CypB at the cell surface, and that the signal could be transduced by CypB via its peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) activity toward CD147.

First characterized as the molecular targets of the immunosuppressive drug Cyclosporin A (CsA)<sup>1</sup>, cyclophilins (CyPs) constitute one class of the prolyl *cis/trans* isomerases that catalyse the *cis/trans* interconversion of the peptide bond preceding a proline (1,2). Members of this class such as the predominantly cytoplasmic CypA, the

secreted CypB and the mitochondrial CypD are small ubiquitous proteins sharing a high sequence homology (65% identity between human CypA and CypB), that translates into a closely related three dimensional fold. Indeed, the NMR and crystal structures of CypA free and in complex with CsA (3-6), as well as the crystal structure of CypB in complex with a cyclosporine analogue (7) all show the same core structure composed of eight antiparallel  $\beta$ -strands forming a  $\beta$ -barrel surrounded by  $\alpha$ -helices and loops. Whereas the nearly identical active site and CsA binding pocket further underscore their close relationship, both proteins do differ in their N- and C-termini, CypB containing two peptides of some 10 residues long that are lacking in CypA.

CypA and CypB act in the progression of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and psoriasis, but are equally involved in the first steps of certain viral infections (8-10). Their inflammatory activity is conditioned by their interaction with heparan sulphate proteoglycans (HSPGs) and the membrane receptor CD147, two binding partners at the cell surface of T cell lymphocytes, granulocytes and macrophages, (11-14). Significantly, both molecular partners have equally been described as co-receptors for the HIV-1 virus (10,12,15).

Both intact prolyl *cis/trans* activity of the cyclophilins and the presence of the Pro<sup>180</sup> residue of CD147, located on one of the two extra-cellular immunoglobulin-like domains, are required for its chemotactic activity, raising the possibility that isomerisation of the accessible Asp<sup>179</sup>-Pro<sup>180</sup> peptide bond might be the molecular signal that translates ultimately in chemotactic activity (14,16). Mutations in the catalytic site, with

residues such as Trp<sup>129</sup>, Phe<sup>67</sup> and Arg<sup>62</sup> (17) negatively interfere with the signal transduction. Such a cyclophilin-dependent mechanism of regulation has already been demonstrated for the tyrosine kinase Itk (18), where CypA catalyzes the isomerization of Asn<sup>286</sup>-Pro<sup>287</sup> peptide bond. According to the isomerization state in *trans* or *cis* of this peptide bond, the Itk SH2 domain interacts with either its natural phosphotyrosine substrate or with its own SH3 domain (19).

Both CypA and CypB *in vitro* induce Erk1/2 phosphorylation, calcium flux generation and chemotaxis of responsive cells, although CypB is a more potent agonist and uniquely triggers integrin mediated adhesion of T lymphocytes to fibronectin (11,13,14). Tight binding of CypB to HS moieties of proteoglycans is one source for this increased potency, as mutations in the N-terminal <sup>3</sup>KKK<sup>6</sup> and <sup>15</sup>YFD<sup>17</sup> tripeptide motifs not only affect HS binding (16) but equally reduce CypB chemotaxis and abolish integrin-mediated adhesion (11,17). Mutants deprived of enzymatic activity still bind to the cell surface of T lymphocytes, but are unable to induce biological responses, indicating that CypB has to interact simultaneously with both CD147 and HSPGs. Very recently, the interaction of CypB with the HS moieties of syndecan-1 was shown to promote and/or stabilize the complex between syndecan-1 and CD147, resulting in MAPK activation and subsequent pro-adhesive activity (20).

The minimal motif of HS interacting with CypB was mapped to an octasaccharide (21). However, the length is not the sole parameter defining the complexity of the sugar chains of HSPGs, as the exact sulphation pattern and the conformation of the glycanic moieties equally may contribute to the specificity of the interaction (22-26). Altogether, these data suggest that the high-affinity binding of CypB to specialized HS moieties stabilizes the interaction with its substrate or directly modulates its PPIase activity, resulting in an enhanced intracellular signalling *via* CD147.

We examine here by NMR spectroscopy the interaction between heparin derived oligosaccharides and CypB. Whereas we confirm the direct implication of the N-terminal extension that distinguishes CypB from CypA in the HS binding, NMR chemical shift mapping and NOE data indicate a binding site of heparin directed

towards the catalytic site rather than to the N-terminal  $\beta$ -strand containing the <sup>15</sup>YFD<sup>17</sup> motif. This novel identification of a HS binding patch close to the active site raises the possibility of a functional coupling between HS binding and prolyl *cis/trans* isomerase activity. We use EXSY spectroscopy in the absence or presence of an oligosaccharide to quantify the CypB isomerisation efficiency towards the Asp<sup>179</sup>-Pro<sup>180</sup> bond in a CD147-derived peptide. Finally, the N-terminal peptide responsible for the CypB specific induction of T-lymphocyte adhesion to the extracellular matrix being absent from the X-ray structure due to proteolytic cleavages during the CypB purification procedure (7), we derive its structure based on NMR parameters, and investigate whether the heparin binding consensus sequence (<sup>3</sup>EKKKGPKV<sup>10</sup> in CypB) adopts any regular heparin binding structure (23).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Expression and purification of Cyclophilin B* – A recombinant plasmid, *pET15b-CypB*, was constructed in order to increase the production of recombinant human CypB. The sequence coding CypB was amplified from the previously described plasmid PCGF (27), using the following forward primer 3'-act tcc atg gcc gat gag aag aag-5' and the reverse primer 5'-aca agg atc cta ctc ctt ggc gat-3' then was inserted in a *pET15b* plasmid (Merck-NOVAGEN, Darmstadt) between the restriction enzyme sites *NcoI* and *BamHI*. The 24 first amino acids corresponding to the signal sequence were not included in recombinant CypB. Recombinant CypB starts with Ala<sup>1</sup> and ends with Glu<sup>184</sup>. Our numbering is as in the X-ray PDB file 1CYN<sup>2</sup> (7). The *pET15b-CypB* plasmid was introduced in *E. coli* BL21(DE3) *pLysS* cells (NOVAGEN), and a <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C labelled sample was prepared by growing cells in M9 minimal medium with <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl and <sup>13</sup>C glucose as sole nitrogen and carbon sources, respectively. The <sup>15</sup>N-<sup>2</sup>H labelled sample was prepared by growing cells in a semi-rich deuterated medium (M9 medium in 99.5% D<sub>2</sub>O with <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, <sup>2</sup>H<sub>7</sub>-glucose (2g/L) and 20 % of deuterated-<sup>15</sup>N rich medium (*v/v*) (Isogro, Cambridge isotopes laboratories). The cells were grown at 37°C to reach an OD<sub>600</sub>=0.8 and expression was induced at 20°C with 0.4mM IPTG. The cells were harvested after overnight

induction and were disrupted in lysis buffer (20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.8, 10mM EDTA, Proteases inhibitor cocktail (Roche), DNaseI, RNaseA) by sonication. Cell debris were removed by centrifugation at 20,000xg for 30 min then DNA was precipitated with streptomycin sulphate. After centrifugation at 15,000xg for 30 min the supernatant was dialysed (6-8kDa cut-off) overnight against 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.85. The recombinant CypB was sequentially purified by ion exchange (SP sepharose Fast Flow) and gel filtration (Superose12 Prep Grade) chromatography. Finally the protein was dialysed against 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.3, 40mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT and concentrated by ultra-filtration (cut-off 10kDa). Recombinant CypB was filtered (0.2 $\mu$ ) and stored at -20°C.

*Preparation of heparin derived oligosaccharides* – The heparin-derived oligosaccharides were prepared as previously described (21). Briefly, heparin was enzymatically digested with heparinase I at 30°C. The resulting digestion mixture was desalted on a Sephadex G-10 column (GE Healthcare) then fractionated by gel filtration chromatography on bio-Gel P-6 (Bio-Rad Laboratories) in the following buffer: 0.2M NH<sub>4</sub>Cl, pH3.5. The fractions corresponding to increasing dp oligosaccharides were desalted then freeze dried. The heparin-derived oligosaccharides fractions were kept at -20°C until used.

*Peptide from CD147* – A 15 amino acid long peptides of CD147 centered around Pro<sup>180</sup> (sequence <sup>173</sup>NLNMEADPGQYRCNG<sup>187</sup>) was synthesized by classical solid phase chemistry (Neosystems, Strasbourg, France), and purified to homogeneity by HPLC. Upon dissolving this peptide in a phosphate buffer to a 1mM concentration, some precipitate was observed. Comparison with NMR spectra of soluble peptides allowed an estimation of the concentration of the soluble fraction at 0.5mM.

*NMR spectroscopy* – All spectra were recorded on either a Bruker Avance 800MHz spectrometer with standard triple resonance probe or a Bruker Avance 600MHz equipped with a cryogenic triple resonance probe head, at 25°C (Bruker, Karlsruhe, Germany). The proton chemical shifts were referenced using the methyl signal of TMSP (sodium 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-d. 4. ]propionate) at 0 ppm. The spectra were processed with the Bruker TOPSPIN software package and

in-house routines with the SNARF program (van Hoesel FHJ, 2000 SNARF v.0.8.9, University of Groningen, The Netherlands). Resonance assignment of the CypB protein residues was performed by using the classical strategy of paired triple resonance experiments (28) on a <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C CypB sample at 0.25mM in a 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.3, 40mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT buffer using standard Bruker pulse programs. HNCACB/CBCAcoNH spectra were recorded with 512/52/71 complex points for <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C windows of 13.9/36/70ppm centered at 4.8/118/37.4ppm, respectively. HNCO and HN(CA)CO spectra were recorded with 512/52/24 complex points for <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C windows of 13.9/36/20ppm centered at 4.8/118/172.5ppm, respectively. A 3D NOESY-(<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC) spectrum with a mixing time of 400ms on a 350 $\mu$ M sample of <sup>2</sup>H-<sup>15</sup>N CypB in the presence or absence of dp12 was acquired with 512/32/148 complex points in the <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H dimensions. All spectra were zero filled to 1k/256/256 complex points and multiplied by a shifted square sine bell function prior to Fourier transformation.

The heteronuclear NOE effect was measured with standard refocused HSQC pulse sequence in the presence or absence of proton decoupling during the 5s relaxation delay, on a 250 $\mu$ M sample of <sup>15</sup>N-CypB in the absence or presence of dp12. HeteroNOE values were derived from the intensity ratios of the cross peak with and without proton decoupling.

Residual dipolar couplings (RDCs) were collected on CypB and CypB-dp12 complex at 0.2 mM in 95% H<sub>2</sub>O, 5% D<sub>2</sub>O, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.3, 2.5mM EDTA, 5mM DTT, 85 $\mu$ M TMSP-D4 (TriMethyl Silyl Propionate). RDCs were acquired on these uniformly <sup>15</sup>N labeled samples suspended in a liquid crystalline medium consisting of 5% (w/v) polyoxyethylene 5-lauryl ether (C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>) and 1-hexanol (Sigma) with a molar ratio of 0.85 (29). 1D<sub>NH</sub> dipolar couplings were measured at 600 MHz and were obtained using 2D TROSY-type experiments (30,31). Quadrature detection in the indirect dimensions of the multidimensional experiments was achieved by the echo/antiecho detection scheme for <sup>15</sup>N, and by the TPPI-States method for <sup>1</sup>H. 64 scans were recorded per (t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>) increment. Data processing and peak picking were performed using the software SNARF (van Hoesel

FHJ, 2000 SNARF v.0.8.9. University of Groningen, The Netherlands). Because the complex partially precipitated, RDC values on the isolated CypB were of better quality, and were used for the refinement of the core region (see below).

The PPIase activity of CypB on the CD147 peptide was assessed on a sample of 0.5mM CD147 peptide and 25 $\mu$ M CypB, in the absence or presence of dp14. EXSY spectra were acquired at 800MHz with mixing times of 50, 100, 200, 300 and 400ms, and 2k/256 complex points in the direct and indirect proton dimension, and were Fourier transformed to 4k/1k complex frequency points after zero filling. Spectra at 100, 200 and 400ms were repeated on an independent sample to evaluate the error margins. Because the exchange cross peaks are close to the diagonal, the maximal peak intensity rather than the peak integral was measured for the Asp<sup>179</sup> *cis/trans* cross peaks, and normalized to the corresponding diagonal peak intensity. The exchange rate  $k_{\text{exch}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) was calculated by fitting the theoretical curve given by Eq. (1) (32) to the experimental data, where % [*cis*  $\rightarrow$  *trans*], expressed as the intensity of the exchange cross peak to the diagonal peak, corresponds to the fraction of molecules that undergoes a transition from *cis* to *trans* conformation during the mixing time (MT), and  $1/a$  is the excess of *trans* over *cis* forms, determined on the basis of the 1D spectra of Figure 1c.

$$(1) \quad \%[cis \rightarrow trans] = a \frac{1 - \exp(-(1 + 1/a)k_{\text{exch}} \times MT)}{1 + \exp(-(1 + 1/a)k_{\text{exch}} \times MT)}$$

*Modelling of CypB structure in its complex with dp12* – The peptide ADEKKK was manually constructed and added at the N-terminus of the X-ray structure of CypB (PDB code 1CYN<sup>2</sup>). This completed structure formed the starting point for the refinement procedure. Briefly, the core region (residues 15-173) was first refined using the RDC values obtained on the isolated CypB as input for the XPLOR-NIH program (33,34). Using the program MODULE (35) and the RDC values obtained on the CypB-dp12 complex, we calculated the alignment tensor for the complex. This tensor was then fixed in a second refinement step for the full structure. Input data were back-calculated NOEs, backbone dihedral angles and

hydrogen bonds for the core region, and the experimental NOEs, dihedral angle constraints from the <sup>13</sup>C chemical shifts and RDC values for the N- and C-termini. A total of 250 structures was calculated, of which we analyzed in detail the 20 structures of lowest energy. Further details of the refinement steps can be found in the Supplemental Materials.

The Pymol software was used for molecular graphics (DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) on World Wide Web <http://www.pymol.org>).

## RESULTS

### *Molecular characterization of the partners*

– Based on its high isoelectrical point, the recombinant human cyclophilin B, 184 amino acids residues, was purified in one step by ion exchange chromatography to above 95% based on SDS-PAGE. The protein eluted from gel filtration chromatography as a single peak with an elution volume corresponding to a monomer of 20kDa, and the good dispersion of the methyl groups in the 1D NMR spectrum indicated a globular tertiary folding (Fig. 1A). A doubly labelled <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C CypB was used for the NMR assignment strategy and all backbone resonances (except for Ala<sup>1</sup> and Lys<sup>52</sup>) and C $\beta$  carbons were fully assigned<sup>3</sup>. In order to observe potential NOE contacts with heparin (see below), a deuterated <sup>2</sup>H-<sup>15</sup>N CypB was prepared. From the 1D spectrum (Fig. 1A), the deuteration level was estimated to be around 95%. Even after one week in aqueous buffer, several amide functions from the core of the protein did still not exchange with protons from the solvent, thereby defining the rigid central core of the protein.

Previous gel mobility shift assays studies had determined an octasaccharide as the minimal length required for efficient binding of heparan sulphate to CypB (21). Therefore, we only considered oligosaccharides with a higher degree of polymerisation (dp) in this work, and present the results with dp12 or dp14 oligosaccharides. As these molecules come from enzymatic digestion of heparin with heparinase I, there are several sources of heterogeneity, at the level of the sequence and the sulphation pattern. In order to minimize these heterogeneities for the NMR experiments, we selected for those dp12 oligosaccharides species

that interact most tightly with CypB by mixing an excess of dp12 with CypB followed by purification of the complex by gel filtration chromatography. An even more stringent selection criterion was introduced by incubation of the oligosaccharide/protein mixture in 400mM of NaCl before and during the gel filtration (Fig. 1B). As the interaction between CypB and heparan sulphates is expected to be essentially driven by electrostatic forces, the high ionic strength should preclude binding of oligosaccharides species that weakly interact with CypB. Following the gel filtration, the buffer was exchanged to reduce the salt concentration to 40mM. Despite this stringent procedure, we cannot exclude that our heparin oligosaccharides still contain some degree of structural heterogeneity.

In order to assess a potential enzymatic activity of CypB toward CD147 and to quantify the modulation of this activity by the heparin oligosaccharides, we used a synthetic peptide of 15 amino acids,  $^{173}\text{NLNMEADPGQYRCNG}^{187}$ , centered around the Pro $^{180}$  CD147 residue. This CD147 peptide was characterised by homonuclear NMR spectroscopy, and both the absence of long range NOE contacts and  $J_{\text{HN-H}\alpha}$  constants around 6Hz indicate the absence of stable secondary structure. Both the *trans* and *cis* forms of the central Pro $^{180}$  could be identified, and from the intensity of the *cis* and *trans* forms of the Asp $^{179}$  amide proton, we estimate a *cis/trans* ratio of 6% (Fig. 1C). The dual proline conformation shows up not only as distinct resonance frequencies of the flanking amide protons, but also as far as the Tyr $^{184}$  amide group (Supplemental Figure 1).

*Definition of the CypB zone in interaction with oligosaccharide dp12* – A first complex between  $^{15}\text{N}$  labelled CypB and dp12 was obtained by mixing the two molecules in 400mM NaCl to a molar ratio of 1:10, in order to ensure the ligand saturation of CypB (21). This complex was then purified by gel filtration chromatography using the same high ionic strength buffer (400 mM NaCl) to preferentially keep those dp12 species that strongly interact with CypB. In order to define the CypB residues involved in the interaction with a heparin-derived oligosaccharides dp12, we compared  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of CypB alone and CypB in complex with dp12. Only a limited subset of CypB residues were affected by the

interaction with the oligosaccharide dp12, excluding major conformational changes upon complex formation (Fig. 2). Previously, two CypB motifs,  $^4\text{KKK}^6$  and  $^{15}\text{YFD}^{17}$  (16), had been proposed to be directly involved in the interaction with heparan sulphates. Mapping the chemical shift changes along the sequence using our sequence specific assignment confirmed the N-terminal  $^4\text{KKK}^6$  motif as an effective part of the heparin binding site. The  $\text{H}_\text{N}$  resonances of these three lysine residues undergo the most important shift upon heparin binding (Fig. 2A). However, the binding of dp12 to CypB had no influence on the NMR signals corresponding to the residues of the  $^{15}\text{YFD}^{17}$  motif (Fig. 2B), despite the fact that a  $^{15}\text{YFD}^{17}$  deletion mutant was previously found unable to bind efficiently heparan sulphates (16,21). We did several additional chemical shift mapping experiments with CypB and different heparin-derived oligosaccharides (dp8, dp12 and dp14), but were unable to detect any perturbation of these YFD motif resonances. These data suggest an indirect participation of the YFD motif in the binding of the heparan sulphates, probably through destabilization of the N-terminal  $\beta$  sheet. Beyond the N-terminal KKK motif, three additional regions of the protein had their amide chemical shift affected upon binding of dp12. These regions correspond to the C-terminal strand, the region 34-43 and the region 95-102 (Fig. 2E and Fig. 3D). The backbone amide proton from the lysine 97, lysine 99 and furthermore the H $\epsilon$ 1 from the side chain from tryptophane 129 shifted in presence of dp12, extending the interaction zone towards the active site of CypB (Fig. 3D). The latter one is known to play a dual role in the binding of CypB to cyclosporin A and to CD147. In conclusion, whereas the previous mutational analysis had positioned the heparan sulphate binding site and the substrate binding site of CypB at opposite sites of the protein, we show here that these two sites are contiguous. Our identification of 12 lysines out of a total of 25 (but no arginine) in the full interaction zone confirms that the complex formation is mainly driven by ionic interactions between lysines side chains and sulphate groups of HS.

The gel filtration experiment should ideally yield a 1:1 complex, with selection for those oligosaccharides that contain an optimal binding pattern. However, going through this procedure

precludes a simple titration experiment to derive an affinity constant. Therefore, in order to estimate the order of magnitude of the affinity in solution between CypB and a dp12 heparin-derived oligosaccharide, we did a reverse titration experiment. On the sample with the complex CypB-dp12, purified by gel filtration chromatography, we removed half of the sample and replaced it by an equivalent volume of CypB alone at the same concentration, and then recorded a new  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum. Resonances that were previously affected upon addition of dp12 shifted back to an intermediate position between free CypB and CypB bound to dp12 (Fig. 2D). This suggests that on the NMR time scale, the heparin fragment exchanges rapidly between bound and free states, corresponding to an interaction of CypB and dp12 with a dissociation constant in the micromolar range or even weaker.

*NMR characterisation of the CypB/dp12 complex* – Our results, together with previous studies, point out an important role of the  $^4\text{KKK}^6$  motif from the CypB N-terminus in the binding of heparan sulphates molecules. This N-terminus is lacking in the X-ray structure of CypB (PDB code 1CYN<sup>2</sup>) and structural data are only available starting from Gly<sup>7</sup>, as the first 6 residues had undergone proteolytic cleavages during the purification process (7). In the absence of proteolysis of the N-terminus during our purification, we recorded a 3D NOESY- HSQC NMR experiment on the  $^2\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CypB alone or in complex with dp12 and compared the  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\text{N}$  NOE patterns of both spectra. The near identity of the NOE patterns involving residues from the core region in both spectra confirms that the dp12 binding does not induce major conformational changes in the CypB structure. Moreover, most of the NOEs observed could be predicted from HN-HN distances derived from the X-ray structure, suggesting that this X-ray structure is a reasonably good starting point for the structure of the CypB bound to dp12. As for the C-terminus, we detected NOEs between the Glu<sup>184</sup> and Tyr<sup>101</sup>, Gly<sup>102</sup>, Trp<sup>105</sup> side chain (H $\epsilon$ 1) and between Lys<sup>183</sup> and the Trp<sup>105</sup> side chain (Fig. 4A). The distance between the  $\text{H}_\text{N}$  of Glu<sup>184</sup> and the H $\epsilon$ 1 proton of Trp<sup>105</sup> in the crystal structure being 9.2Å, the observation of a clear NOE contact between both protons suggests that the C-terminus of CypB in solution is closer

to the core of the protein than in the X-ray structure. However, these structural differences for the C-terminus are not induced by dp12 binding, as we did observe the same NOEs with comparable intensity in the NOESY-HSQC spectrum of the free protein. Finally, several NOEs were observed between, residues in the region 7-10 and the region 179-183. These observations correlate with the X-ray structure where these regions of CypB form a small  $\beta$ -sheet.

The absence of NOEs between the 3 lysines in the N-terminus and the rest of the protein suggests that this motif is highly flexible, which might be a determining character for it being the initial and preferential binding site for HS. We measured this dynamical aspect of the CypB backbone by heteronuclear NOE experiments in the presence or absence of dp12 (Fig. 5). A significant increase of heteronuclear NOEs was observed for the first ten CypB residues upon binding of dp12, whereas a slight decrease of the heteronuclear NOE values was observed for the residues 180-183. These observations suggest a direct interaction of the N-terminal lysine residues in the consensus sequence with the heparin-derived oligosaccharide, conferring a more rigid character upon binding. It further suggests that the chemical shift perturbations observed in the C-terminus result from indirect effects rather than from a direct interaction with the oligosaccharide.

As the interaction between heparan sulphates and its binding partners involves negatively charged sulphate groups of HS and positively charged lysine side chains, backbone amide protons are seldom closer than 5Å from the sugar protons, and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  intermolecular NOE correlations are not easily obtained (36-38). However, the use of a highly deuterated CypB limits spin diffusion (39), and moreover avoids confusion between heparin protons and aliphatic side chain protein resonances. We indeed detected some intermolecular NOEs between dp12 and Lys<sup>5</sup>/ Lys<sup>6</sup> (Fig. 4B). These NOEs, involving protons in the range of 3.8-4.3 ppm, are absent in the control experiment on the same protein preparation without dp12 (Fig. 4C), and probably correspond to protons from the carbohydrate rings of dp12. Due to the severe overlap of the heparin protons and the additional molecular heterogeneity of the heparin-derived oligosaccharide dp12, these signals could however not be assigned without

ambiguity, but they do confirm the direct physical interaction between the <sup>4</sup>KKK<sup>6</sup> CypB motif and the dp12 molecule.

Because of the limited information that could be extracted from the NOEs involving residues in the N-terminal region, we assigned the <sup>13</sup>C chemical shifts in the absence and presence of dp12, and obtained RDC values on a partially oriented sample of the isolated and dp12 complexed protein. These data yield constraints on the dihedral angles for the former, and long range orientational constraints for the latter. All experimental constraints were used in a refinement protocol aimed at completing the structure of CypB in its complex with dp12.

*Modelling of CypB in the CypB/dp12 complex* – A multistep protocol starting from the X-ray structure completed with coordinates for the lacking N-terminus (<sup>1</sup>ADEKKK<sup>6</sup>) was used to obtain a family of structures compatible with all experimental data. The 20 structures of lowest energy (Fig. 3A) well conserve the typical cyclophilin fold, and when superimposed on all C $\alpha$  atoms, give an overall rmsd of 0.87±0.27Å. When we superimpose the core regions of these structures, from residue 15 to 173, and calculate the rmsd values for the isolated N- and C-terminal extensions, we find values of 2.39±1.05Å and 1.14±0.48Å, respectively, indicating still a reasonable definition of these fragments.

The different CypB regions involved in the dp12 binding as defined by the chemical shift perturbation mapping are close in space and form a well defined heparan sulphate binding site (Fig. 3D), that equally corresponds to the most electropositive area of CypB, containing 12 lysines residues (Fig. 3C). Closer examination of the N-terminus in the CypB model showed that the structure of the consensus sequence XBBXB<sup>X</sup> (<sup>3</sup>EKKKGPK<sup>9</sup>) may lead to the suitable orientation of the lysine side chains for promoting the interaction with HS, although experimental data to define these side chains lack. However, our resulting structures indicate the absence of the canonical  $\alpha$ -helix or  $\beta$ -strand structures that would project the basic side chains into the same direction (23). The strong NH<sub>i</sub>-NH<sub>i+1</sub> contacts that would characterize such a helical conformation were indeed not observed in the 3D spectrum of CypB/dp12. Moreover the absence of regular

secondary structural elements in the N-terminus was confirmed by the <sup>13</sup>C chemical shift index method (40). Finally, our model shows that the N-terminus is more surface accessible than the partially buried C-terminus, in agreement with the experimental relaxation data.

*Enzymatic activity of CypB on a CD147-derived peptide* – Chemical shift mapping suggested that the heparan sulphate binding site extends to the edge of the active site of CypB. Our NOE data further support this result, as dp12 binding on CypB affects the Trp<sup>129</sup> residue which is part of the active site of CypB and plays a crucial role in the binding of Cyclosporin A or the cell surface receptor CD147 (16). Indeed, the NOE patterns of the H $\epsilon$ 1 Trp<sup>129</sup> side chain in presence or absence of dp12 are not identical. In the absence of dp12, no NOE correlations were detected whereas in presence of dp12 the H $\epsilon$ 1 of Trp<sup>129</sup> side chain correlates with the amide proton of the same residue and of two neighbouring residues, Leu<sup>130</sup> and Asp<sup>131</sup> (Supplemental Figure 2). Upon binding of dp12, the Trp<sup>129</sup> side chain could at least transiently be reoriented, opening up the possibility of a functional coupling between the binding of heparin-derived oligosaccharides and the enzymatic PPIase activity of CypB. To further assess this possibility, the enzymatic activity of CypB toward a CD147-derived peptide, centered on the CD147 Pro<sup>180</sup> residue (in bold): <sup>173</sup>NLNMEADPGQYRCNG<sup>187</sup>, was characterized using EXSY NMR spectroscopy. The distinct *trans* and *cis* signals of the Asp<sup>179</sup> amide protons were used to quantify the exchange process. Without CypB, both conformers are in very slow exchange, and no cross peak between isoforms could be detected for mixing times up to 400ms (Fig. 6A and Supplemental Figure 3A). However, when adding CypB in catalytic amounts to the same peptide sample, additional cross peaks connecting the *cis* and *trans* amide protons of Asp<sup>179</sup> are observed (Fig. 6B and Supplemental Figure 3B), confirming experimentally that CypB is able to catalyse the isomerisation of Pro<sup>180</sup> in CD147. Similar exchange peaks equally connected the *cis* and *trans* forms of Gly<sup>181</sup> and Tyr<sup>184</sup>. By varying the mixing time of the EXSY spectra, an exchange rate  $k_{ex} = 51s^{-1}$  was found (Fig. 6D). Addition of CsA to the sample did abolish the exchange cross peaks, confirming that the overlap



between the prolyl *cis/trans* isomerase active site and the CsA binding site (Fig. 6C and Supplemental Figure 3C). As the dp12 binding site extends to the active site of CypB, and as on the cell surface, the heparan sulphate chains of proteoglycans are longer than a dp12 oligosaccharide, we used the longest heparin oligosaccharide, a dp14 molecule, to investigate any functional implications. The same EXSY spectra were thus run with CypB in the presence of dp14. Prolyl *cis/trans* isomerisation was still present, and quantification of the rate led to a similar exchange rate of  $48\text{s}^{-1}$  (Fig. 6D). We therefore conclude that the heparin binding extends up to the active site of CypB, but does not influence directly its enzymatic prolyl *cis/trans* isomerase activity.

## DISCUSSION

Cyclophilins are proteins involved in several inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, and play a role in the HIV-1 viral infection process. It has been shown that both extracellular cyclophilin A and B are able to induce chemotaxis (13,14,41,42) but that only CypB triggers T Lymphocytes adhesion to fibronectin in the extracellular matrix (11). Although homologous, with more than 50% sequence identity for both full-length proteins, the main difference is in the N- and C-terminal extensions that characterize CypB but are lacking in CypA (43). The biological cyclophilin-mediated response requires both the cell surface heparan sulphate proteoglycan (HSPG) and the cell surface receptor CD147. CypB would bind to one or more cell surface HS moiety of syndecan I and subsequently promote the syndecanI-CD147 association, resulting in an activation of p44/42 mitogen-activated kinases and a subsequent integrin-mediated induction of extra-cellular matrix adhesion (20). Precise molecular details of this activation mechanisms are as yet not available, be it for the early interaction steps or for the ensuing signal transduction.

Here, we use heparin-derived oligosaccharides to reproduce the physiological interaction between CypB and the glycan moiety of cell surface HSPG. The sulphated regions of heparin are similar to HS of HSPG. The use of oligosaccharides has already been validated as a

good model to replace longer HS chains (44). Indeed, many structural and biological studies using oligosaccharides were consistent with the *in vivo* biological data (36,45). The minimal binding unit for CypB has previously been shown to be an octasaccharide (dp8). Here, we used dp12 and dp14 oligosaccharides to study the interaction with CypB. Their enzymatic preparation from heparin followed by size exclusion chromatography leads to length-defined compounds with heterogeneous sulphation patterns. In order to minimize this heterogeneity, we purified the CypB-dp12 complex in high salt conditions, which should result in the selection for the stronger interacting species. The 0.4M salt concentration used is lower than the 0.6 M concentration needed to elute CypB from a heparin-sepharose column (46), and our gel filtration data show that we indeed form a complex (Fig. 1B).

The chemical shift perturbation strategy showed that only a defined subset of CypB residues are involved in the dp12 binding. Even though located in 4 different regions of the linear sequence of CypB, they are spatially close and form a well defined HS binding site. NOE data confirm that at least the N-terminal  ${}^4\text{KKK}^6$  motif is involved in direct physical interaction with the sugar moiety, explaining why their triple mutation into  ${}^4\text{AAA}^6$  renders the protein unable to bind HSPG on the cell surface or to trigger the CypB T-lymphocytes adhesion to extracellular matrix. Heteronuclear relaxation data indicate that this interaction results in a loss of mobility for the N-terminal peptide, be it without the establishment of a regular secondary structure element as expected for heparin binding peptides (23).

If only intermolecular NOEs were observed for  $\text{K}^5$  and  $\text{K}^6$ , the complete binding site for dp12 is larger than simply this  ${}^3\text{KKK}^6$  motif. Upon dp12 binding, 44 amide resonances were perturbed. The corresponding residues constitute a well defined binding site on the CypB molecular surface, including next to the N- and C-terminal extensions two loops (37-40 and 95-102) from the CypB core. The length of the defined binding site fits rather well with the length of a heparin-derived dp12 oligosaccharide in a helical conformation ( $1\text{HPN}^4$ ). The binding site is characterized by a groove flanked by lysine ladders on each side. These lysine side chains constitute a positively charged patch on CypB that probably interacts

with the bulky negatively charged sulphate groups of dp12 (22). Chemical shifts in the  $^{15}\text{YFD}^{17}$  peptide, previously identified by site directed mutagenesis as important for the interaction of CypB with HS, did not change upon interaction with dp12. However, only the side chains of Tyr<sup>15</sup> and Asp<sup>17</sup> are solvent accessible whereas the side chain of Phe<sup>16</sup> is buried into the hydrophobic core of CypB. A plausible explanation for the fact that the CypB mutant deleted of  $^{15}\text{YFD}^{17}$  does not directly bind to the heparan sulphate is that this deletion induces a destabilisation of the first  $\beta$ -strand (Thr<sup>11</sup>-Arg<sup>19</sup>) and thus potentially disrupts the location of the N-terminal anchoring patch with respect to the rest of the binding site.

A final interaction zone is defined by the loop of residues 125-133 surrounding the active site. We show specifically that the side chain of Trp<sup>129</sup> not only undergoes chemical shift perturbations through the addition of dp12, but that equally its orientation could be modified as witnessed by differential NOEs. This suggests that the HSPG might exert a dual role in the biological function of CypB. They first might serve to anchor CypB in the close vicinity of the cell-surface receptor CD147, and might in a second stage modify its prolyl *cis/trans* isomerase activity towards this same receptor. Using a synthetic peptide centered on the critical Pro<sup>180</sup> and NMR exchange spectroscopy, we here directly demonstrate that CypB is catalytically active on an extracellular region of the membrane receptor CD147, and that this interaction is blocked by Cyclosporin A. Despite the dp12 binding site extending to the close vicinity of the CypB active site, the enzymatic activity of CypB on the CD147 peptide is not affected upon dp12 binding. This observation agrees with the previous finding that cyclosporin A, that bind in the CypB active site, does not influence the binding of cell surface HS (47,48).

An affinity in the micromolar range between CypB and the dp12 oligosaccharide was inferred from the gradually shifting correlation peaks in

our NMR reverse titration experiment. Such values are plausible if we consider the fact that CypB elutes from a heparin affinity column at 0.6M NaCl (46) and that the HIV-1 Tat transduction domain, which elutes from the same column at 1.6 M, has a  $K_d$  of 0.37 $\mu\text{M}$  for heparin (49). The micromolar range observed is also comparable to the affinity observed for CD44/HA (50) and several FGF/heparin complexes (0.5 to 85  $\mu\text{M}$ ) (51). Strikingly, Allain *et al.* measured a much lower  $K_d$  around 10nm between CypB and the full-length HS on the surface of T-lymphocytes (16,48). The discrepancy with our  $\mu\text{M}$  value could arise from different points. First of all, we used heparin derived oligosaccharides dp12 whereas the cell-based assay used full-length cell surface HSPG. The flexibility of HS glycanic chains are probably length dependent, and this may play a crucial role in the affinity (37). Secondly, at the cell surface the HS chains are linked to the core of HSPG, leading to a crowded environment. Finally, the methods to assess the affinity were not the same. Here, we use in solution NMR spectroscopy on a molecular complex whereas the binding on T-lymphocytes has been evaluated on a surface by competition experiments with radio-iodinated and cold CypB.

CypB only shows weak transient interactions with CD147 peptide, compatible with an enzyme/substrate relationship. Our data thus validate the model proposed by Allain *et al.*, where during the inflammation response CypB interacts with the HS chains of cell surface HSPG and is subsequently locally concentrated in the surrounding of the membrane receptor CD147 (11,20). Without a direct influence of the HS on its enzymatic activity, CypB can isomerize the Asp<sup>179</sup>-Pro<sup>180</sup> peptidyl proline bond of the CD147 extracellular domain, which then triggers in an unknown fashion intracellular signalling events. Finally, we further validate the interaction of CypB with cell surface heparan sulphate as a potential therapeutic target to modulate the cyclophilin mediated inflammation process.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. A. Hamel and G. Vugniaux from DebioPharm (Lausanne, Switzerland) for a generous gift of the CD147 peptide and of Cyclosporin A. The NMR facility used in this study was funded by the

Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS, the Universities of Lille 1 and Lille 2, and the Institut Pasteur de Lille.



## REFERENCES

1. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. (1984) *Science (New York, N.Y)* **226**(4674), 544-547
2. Schreiber, S. L. (1991) *Science (New York, N.Y)* **251**(4991), 283-287
3. Ke, H. (1992) *Journal of molecular biology* **228**(2), 539-550
4. Mikol, V., Kallen, J., Pflugl, G., and Walkinshaw, M. D. (1993) *Journal of molecular biology* **234**(4), 1119-1130
5. Ottiger, M., Zerbe, O., Guntert, P., and Wuthrich, K. (1997) *Journal of molecular biology* **272**(1), 64-81
6. Spitzfaden, C., Braun, W., Wider, G., Widmer, H., and Wuthrich, K. (1994) *Journal of biomolecular NMR* **4**(4), 463-482
7. Mikol, V., Kallen, J., and Walkinshaw, M. D. (1994) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(11), 5183-5186
8. Bukrinsky, M. I. (2002) *Trends in immunology* **23**(7), 323-325
9. Yurchenko, V., Constant, S., and Bukrinsky, M. (2006) *Immunology* **117**(3), 301-309
10. Sokolskaja, E., and Luban, J. (2006) *Current opinion in microbiology* **9**(4), 404-408
11. Allain, F., Vanpouille, C., Carpentier, M., Slomianny, M. C., Durieux, S., and Spik, G. (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(5), 2714-2719
12. Pushkarsky, T., Zybarth, G., Dubrovsky, L., Yurchenko, V., Tang, H., Guo, H., Toole, B., Sherry, B., and Bukrinsky, M. (2001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(11), 6360-6365
13. Yurchenko, V., O'Connor, M., Dai, W. W., Guo, H., Toole, B., Sherry, B., and Bukrinsky, M. (2001) *Biochemical and biophysical research communications* **288**(4), 786-788
14. 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) *The Journal of biological chemistry* **277**(25), 22959-22965
15. Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G., and Gallay, P. A. (2001) *Journal of virology* **75**(19), 9187-9200
16. Carpentier, M., Allain, F., Haendler, B., Denys, A., Mariller, C., Benaissa, M., and Spik, G. (1999) *The Journal of biological chemistry* **274**(16), 10990-10998
17. Carpentier, M., Allain, F., Slomianny, M. C., Durieux, S., Vanpouille, C., Haendler, B., and Spik, G. (2002) *Biochemistry* **41**(16), 5222-5229
18. Andreotti, A. H. (2003) *Biochemistry* **42**(32), 9515-9524
19. Brazin, K. N., Mallis, R. J., Fulton, D. B., and Andreotti, A. H. (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(4), 1899-1904
20. Pakula, R., Melchior, A., Denys, A., Vanpouille, C., Mazurier, J., and Allain, F. (2007) *Glycobiology* **17**(5), 492-503
21. Vanpouille, C., Denys, A., Carpentier, M., Pakula, R., Mazurier, J., and Allain, F. (2004) *The Biochemical journal* **382**(Pt 2), 733-740
22. Vanpouille, C., Deligny, A., Delehedde, M., Denys, A., Melchior, A., Lienard, X., Lyon, M., Mazurier, J., Fernig, D. G., and Allain, F. (2007) *The Journal of biological chemistry*
23. Capila, I., and Linhardt, R. J. (2002) *Angewandte Chemie (International ed)* **41**(3), 391-412
24. Delehedde, M., Allain, F., Payne, S. J., Borgo, R., Vanpouille, C., Fernig, D. G., and Deudon, E. (2002) *Current Medicinal Chemistry -Anti- Inflammatory & Anti-Allergy Agents* **1**, 89-102
25. Gama, C. I., and Hsieh-Wilson, L. C. (2005) *Current opinion in chemical biology* **9**(6), 609-619
26. Rapraeger, A. C., and Ott, V. L. (1998) *Current opinion in cell biology* **10**(5), 620-628
27. Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H. P., and et al. (1991) *The Journal of biological chemistry* **266**(17), 10735-10738

28. Grzesiek, S., Bax, A., Hu, J. S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S. J., Tjandra, N., and Wingfield, P. T. (1997) *Protein Sci* **6**(6), 1248-1263
29. Otting, G., Ruckert, M., Levitt, M. H., and Moshref, A. (2000) *Journal of biomolecular NMR* **16**(4), 343-346
30. Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wuthrich, K. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(23), 12366-12371
31. Rance, M., Loria, J. P., and Palmer, A. G. r. (1999) *J Magn Reson* **136**(1), 92-101
32. Kaplan, J. L., and Fraenkel, G. (1980) *NMR of Chemically Exchanging Systems*, Academic Press, NY
33. Schwieters, C. D., Kuszewski, J. J., and Clore, G. M. (2006) *Progr. NMR Spectroscopy* **48**, 47-62
34. Schwieters, C. D., Kuszewski, J. J., Tjandra, N., and Clore, G. M. (2003) *J Magn Reson* **160**(1), 65-73
35. Dosset, P., Hus, J. C., Marion, D., and Blackledge, M. (2001) *Journal of biomolecular NMR* **20**(3), 223-231
36. Canales, A., Lozano, R., Lopez-Mendez, B., Angulo, J., Ojeda, R., Nieto, P. M., Martin-Lomas, M., Gimenez-Gallego, G., and Jimenez-Barbero, J. (2006) *The FEBS journal* **273**(20), 4716-4727
37. Powell, A. K., Yates, E. A., Fernig, D. G., and Turnbull, J. E. (2004) *Glycobiology* **14**(4), 17R-30R
38. Vanhaverbeke, C., Simorre, J. P., Sadir, R., Gans, P., and Lortat-Jacob, H. (2004) *The Biochemical journal* **384**(Pt 1), 93-99
39. Koharudin, L. M., Bonvin, A. M., Kaptein, R., and Boelens, R. (2003) *J Magn Reson* **163**(2), 228-235
40. Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994) *Journal of biomolecular NMR* **4**(2), 171-180
41. Arora, K., Gwinn, W. M., Bower, M. A., Watson, A., Okwumabua, I., MacDonald, H. R., Bukrinsky, M. I., and Constant, S. L. (2005) *J Immunol* **175**(1), 517-522
42. Xu, Q., Leiva, M. C., Fischkoff, S. A., Handschumacher, R. E., and Lyttle, C. R. (1992) *The Journal of biological chemistry* **267**(17), 11968-11971
43. Galat, A. (1999) *Archives of biochemistry and biophysics* **371**(2), 149-162
44. Angulo, J., Hricovini, M., Gairi, M., Guerrini, M., de Paz, J. L., Ojeda, R., Martin-Lomas, M., and Nieto, P. M. (2005) *Glycobiology* **15**(10), 1008-1015
45. Angulo, J., Ojeda, R., de Paz, J. L., Lucas, R., Nieto, P. M., Lozano, R. M., Redondo-Horcajo, M., Gimenez-Gallego, G., and Martin-Lomas, M. (2004) *ChemBiochem* **5**(1), 55-61
46. Denys, A., Allain, F., Carpentier, M., and Spik, G. (1998) *The Biochemical journal* **336** ( Pt 3), 689-697
47. Allain, F., Denys, A., and Spik, G. (1994) *The Journal of biological chemistry* **269**(24), 16537-16540
48. Allain, F., Denys, A., and Spik, G. (1996) *The Biochemical journal* **317** ( Pt 2), 565-570
49. Hakansson, S., and Caffrey, M. (2003) *Biochemistry* **42**(30), 8999-9006
50. Takeda, M., Terasawa, H., Sakakura, M., Yamaguchi, Y., Kajiwara, M., Kawashima, H., Miyasaka, M., and Shimada, I. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(44), 43550-43555
51. Conrad, H. (1998) *Heparin binding proteins*, Academic press, San diego, CA

## FOOTNOTES

<sup>1</sup> The abbreviations used are: CsA, cyclosporin A; Cyp, cyclophilin; HSPGs, heparan sulphate proteoglycans; HS, heparan sulphate; MAPK, mitogen activated protein kinases; NOESY, Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy; EXSY, EXchange Spectroscopy; dp, degree of polymerization; PPIase, peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase; MT, mixing time; RDCs, residual dipolar couplings; rmsd, root mean square deviation.

<sup>2</sup> Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank = PDB # 1CYN

<sup>3</sup> Landrieu *et al.*, manuscript in preparation

<sup>4</sup> Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank = PDB # 1HPN

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** *A*, Methyl region of the 1D <sup>1</sup>H NMR spectra of <sup>15</sup>N-CypB (in black) and <sup>2</sup>H-<sup>15</sup>N-CypB (in red). *B*, Size-exclusion chromatography elution profiles of the CypB-dp12 complex (solid line), free CypB (dashed line) and free dp12 heparin-derived oligosaccharides (dotted line). Protein profiles are at 280nm, whereas the dp12 profile was recorded at 215nm. *C*, Traces from the <sup>1</sup>H TOCSY NMR spectrum at the amide proton frequency of the *cis* (in red) and *trans* (trans) forms of Asp<sup>179</sup> in the CD147-derived peptide <sup>173</sup>NLNMEADPGQYRCNG<sup>187</sup>.

**Figure 2. Chemical shift perturbations experiment.** *A-D*, Superimposition of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC of free CypB (in blue) and CypB bound to dp12 heparin-derived oligosaccharides (in red). *A*, Region of the spectra centered on the <sup>4</sup>KKK<sup>6</sup> CypB N-terminal motif. *B*, Region of the spectra centered on the residue Tyr<sup>15</sup> from the <sup>15</sup>YFD<sup>17</sup> CypB tripeptide. *C*, Region of the spectra centered on the residues Lys<sup>99</sup> and Tyr<sup>101</sup> which are close to the CypB active site. *D*, Reverse titration experiment where half of the CypB-dp12 sample was removed and replaced by an equivalent volume of CypB alone at the same concentration. A new <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum was recorded (in green) and compared to those of free CypB (in blue) and CypB-dp12 complex (in red). Resonances from the <sup>4</sup>KKK<sup>6</sup> motif that were previously affected upon addition of dp12 (*A*) shifted back to an intermediate position between CypB free and CypB bound to dp12. *E*, Plot of the combined <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N chemical shift perturbations along the CypB sequence. The values were calculated with the following equation: Combined Chemical Shift ( $\delta\Delta$ ) = ( $\delta\Delta_{\text{HN}}^2 + (\delta\Delta_{\text{15N}}/6.51)^2$ )<sup>0.5</sup>. The  $\delta\Delta$  values in the interval 0.018-0.05 ppm are colored yellow, those with  $\delta\Delta$  values in the interval 0.05-0.07 ppm colored orange, and those with  $\delta\Delta$  values >0.07 colored red.

**Figure 3. Structure of CypB in the CypB-dp12 complex.** *A*, Superimposition of the 20 lowest energy conformers of CypB in the CypB-dp12 complex. The structures, shown as C $\alpha$  traces, were fitted on C $\alpha$  and have a rmsd of 0.87Å. *B*, Mean of the structures in *A*. The diameter of the sausage representation is representative of the rmsd at each C $\alpha$  position and the colour goes from marine blue for the lowest C $\alpha$  rmsd (0.14Å) to red for the highest C $\alpha$  rmsd (4.77Å). *C*, Electrostatic potential surface of the CypB model in the same orientation as in *A*. The scale is from +10kT/e, in blue, to -10kT/e, in red. *D*, Representation of the chemical shift NMR perturbations recorded on CypB upon dp12 binding on the molecular surface of the CypB model.

**Figure 4. Intra and intermolecular NOEs in the CypB-dp12 complex.** *A*, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H plane from the NOESY-<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC 3D at the <sup>15</sup>N frequency of H $\epsilon$ 1 Trp<sup>105</sup>. *B,C* Planes through the K6 amide resonance of <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N-CypB complexed to dp12 (*B*) or free in solution (*C*). The additional resonances come from the dp12 sugar moieties.

**Figure 5. Heteronuclear NOE data.** Heteronuclear NOE values of: (A) free CypB and (B) CypB in complex with dp12. The N-terminus residues lose to a large extent their initial flexibility, whereas the extreme C-terminus gains some flexibility.

**Figure 6. EXSY data with the CD147 peptide.** The  $H_N-H_N$  region of a 400ms EXSY spectrum is shown for (A) the isolated CD147 peptide, (B) the peptide in presence of a catalytic amount of CypB, and (C) the peptide with CypB/CsA. The exchange rate in the free peptide is too slow to give observable exchange cross peaks. When catalyzed by CypB, we do observe such peaks, but these disappear upon addition of CsA. (D) Normalized intensity of the exchange cross peaks as a function of mixing time, for CypB (triangles, solid line) or CypB/dp14 (squares, dotted line).

Figure 1

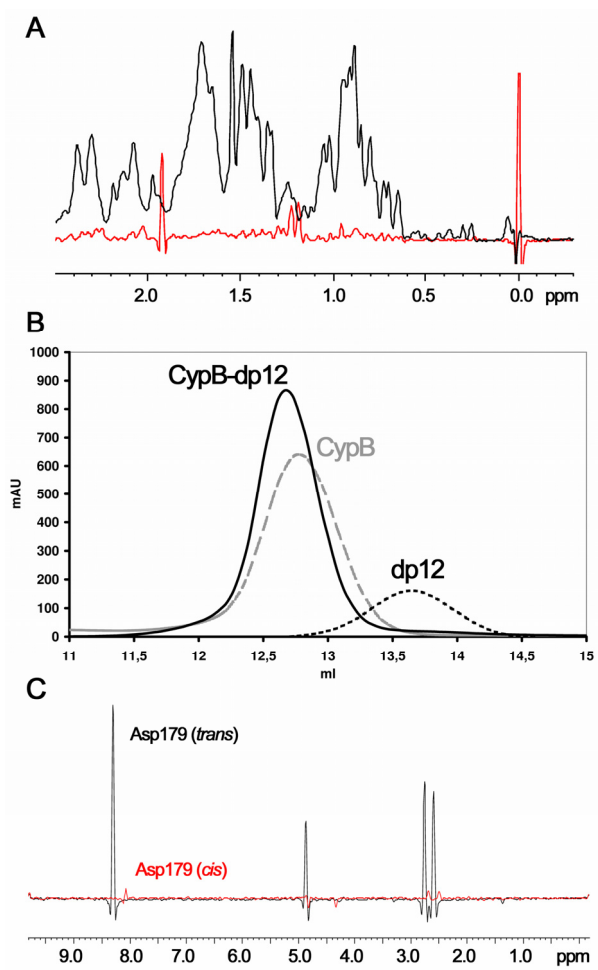




Figure 2

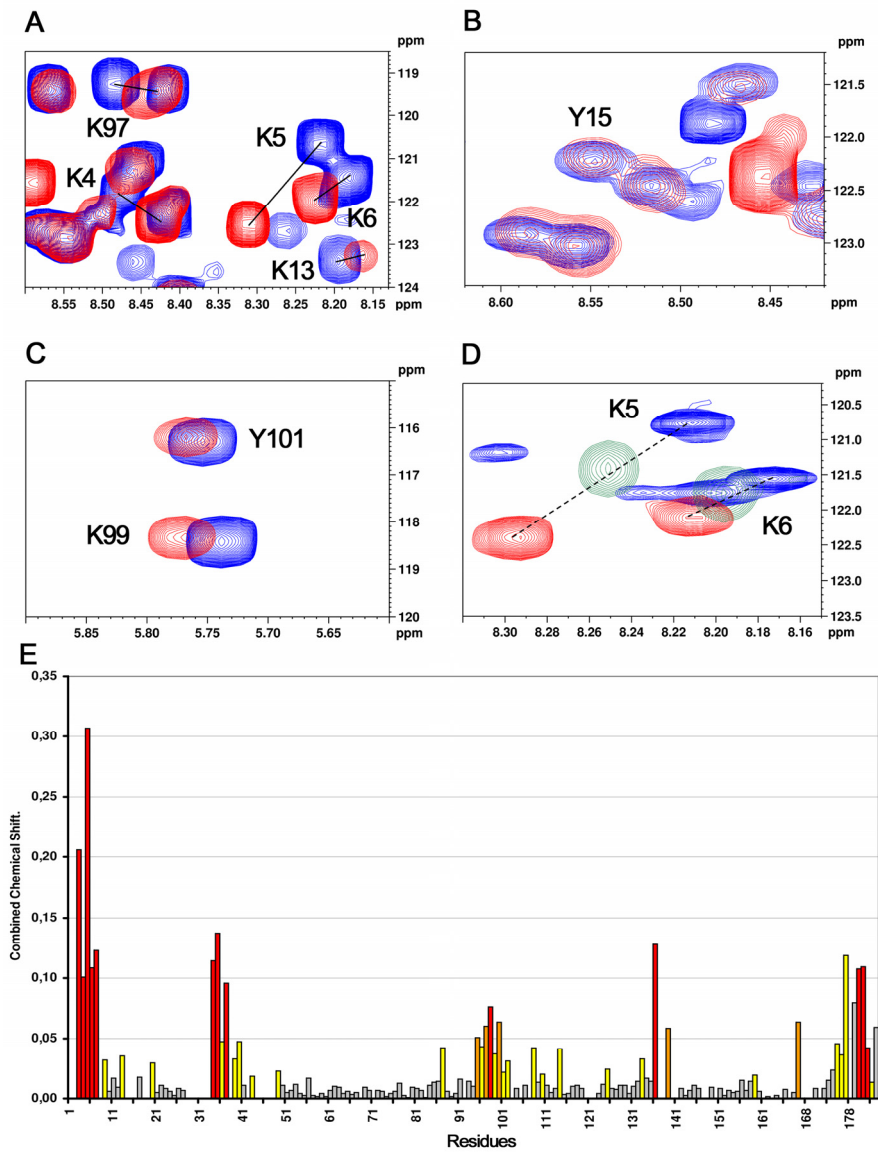


Figure 3

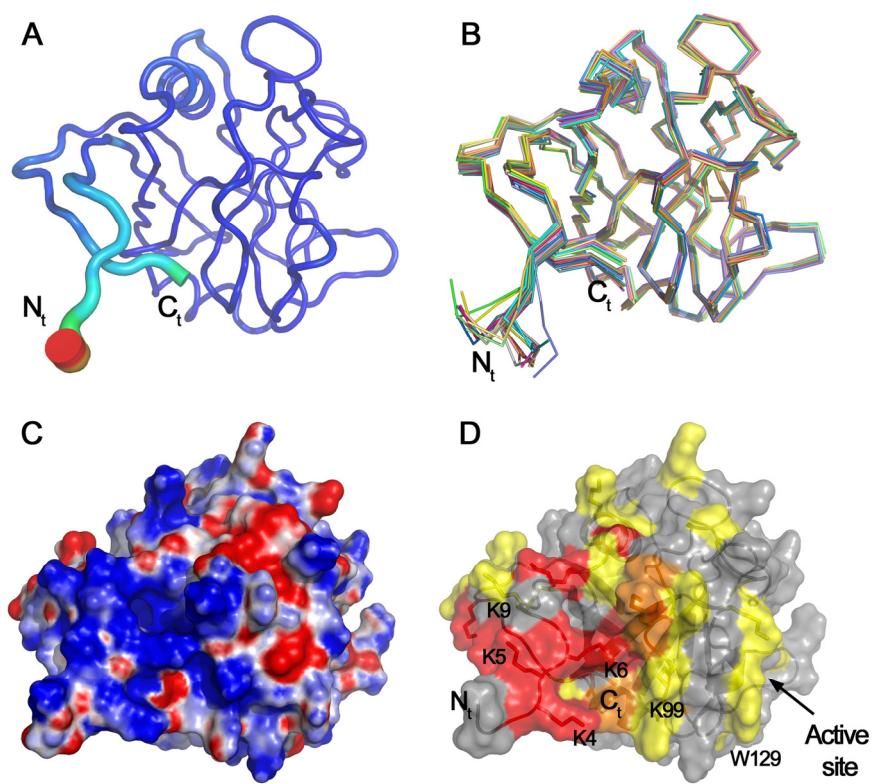


Figure 4

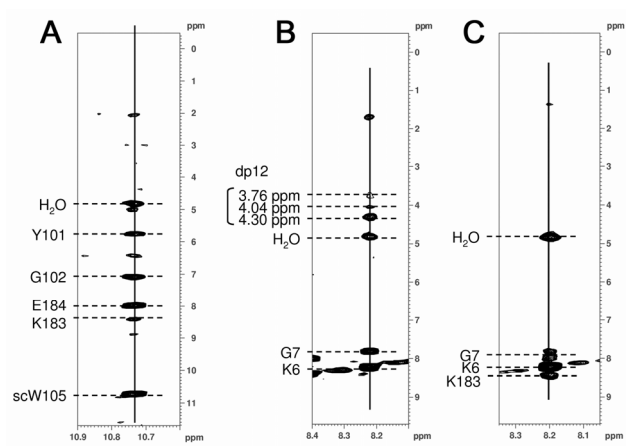


Figure 5

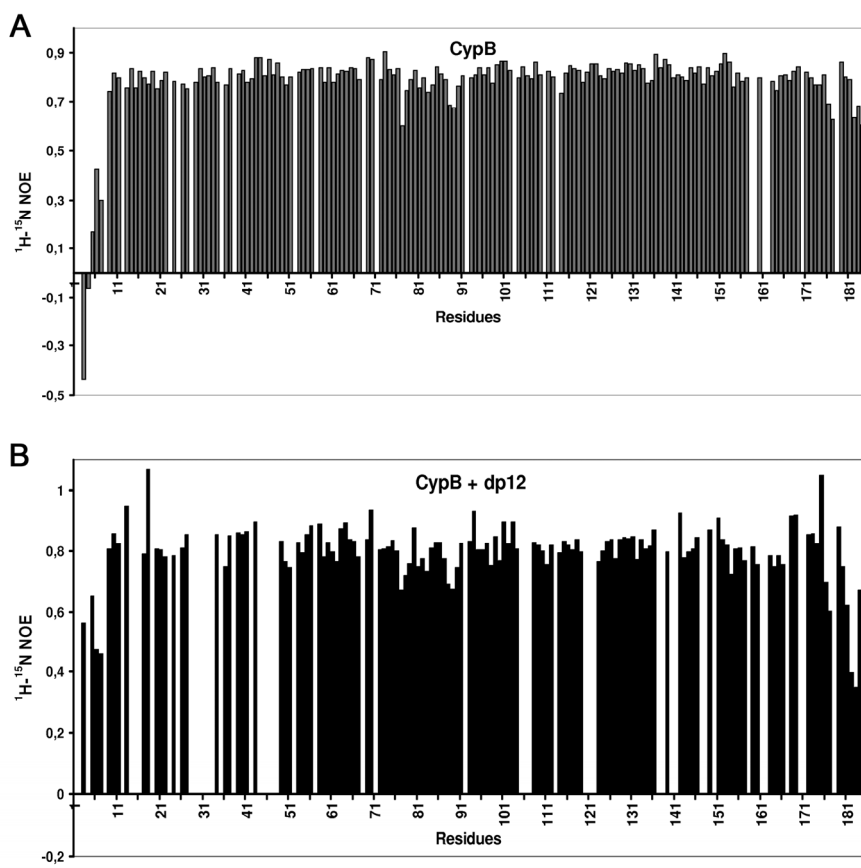
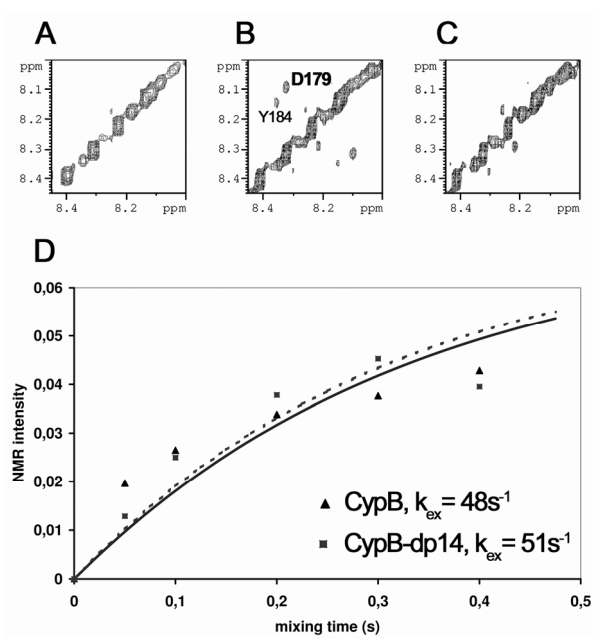


Figure 6



La RMN a permis de confirmer les travaux de Carpentier *et al.* (1999) quant à l'implication du tripeptide KKK présent dans l'extrémité N-terminale de la protéine dans les interactions avec les chaînes HS. En effet, la fixation de la CyPB aux oligosaccharides induit une forte variation du déplacement chimique de ces résidus. Les travaux de mutagenèse dirigée (Carpentier *et al.*, 1999) indiquaient également l'implication d'un autre tripeptide de la région N-terminale dans l'interaction entre les chaînes HS et la CyPB. En effet, la délétion des résidus YFD induisait la perte de la fixation de la protéine. Or, les résultats obtenus par RMN n'indiquent aucune variation du déplacement chimique de ces résidus par la liaison de la protéine aux chaînes HS. La modélisation des données obtenues par RMN montre que la délétion du tripeptide YFD serait à l'origine de la déstabilisation du premier feuillet  $\beta$ . Ainsi, la délétion modifie l'orientation de l'extrémité N-terminale, empêchant son interaction avec les chaînes HS.

Par ailleurs, d'autres régions de la protéine semblent subir des modifications par la fixation des oligosaccharides, comme la zone située au niveau des résidus 125 à 133 qui encadre le tryptophane 129 déterminé par mutagenèse dirigée comme impliquée dans l'activité PPIase et la fixation de la CsA (Carpentier *et al.*, 1999). La fixation aux HS induit une réorientation de la chaîne latérale du tryptophane, ce qui pourrait se traduire par une modification de l'activité PPIase. Or, l'activité enzymatique de la protéine est équivalente en présence ou non d'oligosaccharides, démontrant que ces modifications structurales n'ont pas d'incidence particulière sur la protéine. En outre, le peptide utilisé pour mesurer l'activité enzymatique dérive de la boucle du CD147 et contient le résidu de proline 180, ce qui confirme que la CyPB active les cellules en isomérisant le CD147, comme cela avait été suggéré ces dernières années (Allain *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; 2002).

L'ensemble de ces travaux permet de mieux comprendre l'interaction entre la CyPB et les HSPG. En interagissant spécifiquement avec son motif héparinique porté par le syndécan-1, la CyPB induirait l'isomérisation de la proline 180 du CD147, ce qui se traduirait par une modification conformationnelle de celui-ci à l'origine de l'activation de la voie MAPK. De plus, le syndécan-1 associé au CD147 permet d'une part le ciblage de la protéine à son récepteur ainsi que la présentation de son site actif au niveau de la proline en question. Les travaux réalisés sur ce protéoglycane suggèrent également que son core protéique participe en association avec le CD147 en l'activation de la voie MAPK et aux fonctions d'adhérence.

### III. Participation du CD98 et du CD147 dans l'activation des intégrines par la CyPB

L'adhérence cellulaire induite par la CyPB dépend de l'activation des intégrines  $\beta 1$ . De nombreuses données bibliographiques relient l'activation des intégrines avec le CD147, notamment par l'intermédiaire d'une autre glycoprotéine de surface, le CD98 (Cho *et al.*, 2001 ; Miyamoto *et al.*, 2003 ; Xu & Hemler, 2005). La poursuite de nos travaux a consisté en l'étude du mode d'activation des intégrines  $\beta 1$  par la CyPB en s'intéressant au rôle du CD147 et à l'éventuelle participation du CD98.

Les cellules CHO ne répondent aux cyclophilines qu'une fois transfectées par le CD147, et les réponses cellulaires telles que le chimiotactisme, l'augmentation du flux calcique, l'adhérence ou encore l'activation de la voie MAPK sont inhibées en présence d'anticorps bloquants dirigés contre le CD147 (Allain *et al.*, 2002 ; Pakula *et al.*, 2007 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; 2002).

Le CD147 est une glycoprotéine membranaire exprimée à la surface de nombreux types cellulaires. Cette expression lui confère des activités variées. Ainsi, il a été décrit pour sa capacité à induire l'expression de MMP, à réguler l'activation des lymphocytes et à servir de chaperone pour les transporteurs de monocarboxylates MCT-1 et -4. Il est également impliqué dans la régulation de phénomènes d'adhérence. Il est associé aux intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 1$  (Berditchevski *et al.*, 1997) et induit l'agrégation homotypique des monocytes U937 par un mécanisme impliquant LFA-1 et ICAM-1 (Kasinrerk *et al.*, 1999).

Ces fonctions du CD147 présentent de nombreuses similitudes avec une autre glycoprotéine, la chaîne lourde du CD98 initialement décrit comme un antigène précoce des cellules T et B. Elle présente une distribution cellulaire large et forme un hétérodimère par l'intermédiaire d'un pont disulfure avec des chaînes légères à 12 domaines transmembranaires décrits comme transporteurs d'acides aminés (Nakamura *et al.*, 1999 ; Chillarón *et al.*, 2001). Le CD98 régule l'affinité des intégrines pour leurs ligands, notamment en augmentant l'interaction entre les intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et la trombospondine, et induit l'agrégation homotypique des cellules, ce qui traduit l'activation des intégrines (Fenczik *et al.*, 1997 ; Chandrasekaran *et al.*, 1999 ; Cho *et al.*, 2001 ; 2003). De nombreuses études réalisées sur différents types cellulaires ont suggéré l'existence d'interactions entre le CD98 et les intégrines  $\beta 1$ . Cette association met en jeu les domaines transmembranaires et cytoplasmiques du CD98 et le domaine cytoplasmique de l'intégrine, et plus précisément une courte région

contenant 2 résidus de thréonine (Zent *et al.*, 2000 ; Fenczik *et al.*, 2001 ; Merlin *et al.*, 2001 ; Rintoul *et al.*, 2002 ; Cai *et al.*, 2005 ; Prager *et al.*, 2007). Cette interaction est fonctionnelle car sa perte conduit à une diminution de la signalisation induite par les intégrines, notamment celle conduisant à la formation de la plaque focale d'adhérence telle que la phosphorylation de FAK et de la paxilline (Warren *et al.*, 2000 ; Mori *et al.*, 2004 ; Feral *et al.*, 2005 ; Cai *et al.*, 2005). Le CD98 est également un inducteur de la fusion cellulaire induite par les virus ou à l'origine de la formation d'ostéoclastes (Higuchi *et al.*, 1998 ; Tajima *et al.*, 1999 ; Mori *et al.*, 2004).

Les travaux sur le CD98 ont montré que l'agrégation homotypique et la fusion cellulaire induites par le CD98 peuvent être inhibées par des anticorps anti-CD147 (Cho *et al.*, 2001 ; Mori *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que le CD147 pourrait coopérer avec le CD98 pour réguler les fonctions des intégrines  $\beta 1$ . L'hypothèse d'un complexe régulateur de l'activité des intégrines formé par le CD147 et le CD98 a conduit Xu et Hemler (2005) à rechercher son existence par des méthodes de couplage covalent et de co-immunoprécipitation. Ils ont ainsi mis en évidence une interaction entre le CD147 et le CD98 eux mêmes associés à leur transporteur respectif. Ce complexe serait associé aux intégrines  $\beta 1$  et participerait à leur activation (Cho *et al.*, 2001, Xu & Hemler, 2005). Le domaine immunoglobuline du CD147 est responsable de cette interaction. La découverte de ce complexe explique pourquoi les anticorps anti-CD147 inhibe l'agrégation ou la fusion cellulaire induite par le CD98.

La CyPB induit l'adhérence des lymphocytes T sur la fibronectine par l'intermédiaire des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$  (Allain *et al.*, 2002). Nos travaux récents ont démontré qu'un complexe membranaire formé du syndécan-1 et du CD147 est nécessaire à l'adhérence cellulaire induite par la CyPB (Pakula *et al.*, 2007). L'hypothèse de la participation du CD98 à l'activité pro-adhésive de la CyPB a été étudiée dans notre laboratoire et les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication en révision dans *Experimental Cell Research*.

« Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependant activation of protein kinase C $\delta$  and p44/42 mitogen activated protein kinases ».



# Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C $\delta$ and p44/42 mitogen-activated protein kinases

Aurélie Melchior, Agnès Denys, Audrey Deligny, Joël Mazurier, and Fabrice Allain\*

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche No. 8576 du CNRS, Institut de Recherche Fédératif No. 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

\*Corresponding author: Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel: +33-3-20-33-72-39; Fax: +33-3-20-43-65-55 ; e-mail: [fabrice.allain@univ-lille1.fr](mailto:fabrice.allain@univ-lille1.fr)

Keywords: cyclophilin B / CD147 / CD98 /  $\beta$ 1 integrin / protein kinase C $\delta$  / MAPK

Initially identified as a cyclosporin-A binding protein, cyclophilin B (CyPB) is an inflammatory mediator that induces adhesion of T lymphocytes to fibronectin, by a mechanism dependent on CD147 and  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrins. Recent findings have suggested that another cell membrane protein, CD98, may cooperate with CD147 to regulate  $\beta$ 1 integrin functions. Based on these functional relationships, we examined the contribution of CD98 in the pro-adhesive activity of CyPB, by utilizing the responsive promonocyte cell line THP-1. We demonstrated that cross-linking CD98 with CD98-AHN-18 antibody mimicked the responses induced by CyPB, *i.e.* homotypic aggregation, integrin-mediated adhesion to fibronectin and activation of p44/42 MAPK. Consistent with previous data, immunoprecipitation confirmed the existence of a heterocomplex wherein CD147, CD98 and  $\beta$ 1 integrins were associated. We then demonstrated that CyPB-induced cell adhesion and p44/42MAPK activation were dependent on the participation of phosphoinositide 3-kinase and subsequent activation of protein kinase C- $\delta$ . Finally, silencing the expression of CD98 by RNA interference potently reduced CyPB-induced cell responses, thus confirming the role of CD98 in the pro-adhesive activity of CyPB. Altogether, our results support a model whereby CyPB induces integrin-mediated adhesion *via* interaction with a multimolecular unit formed by the association between CD147, CD98 and  $\beta$ 1 integrins.

## Introduction

First identified as the main binding proteins for cyclosporin A (CsA), cyclophilins are ubiquitously distributed peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases (PPIase), for which most of the studies concerning their biology have focused on their intracellular functions [1,2]. However, accumulating data have indicated a key role for secreted cyclophilins A (CyPA) and B (CyPB) as regulators of inflammation. The expression of these proteins is increased as a response to inflammatory stimuli and oxidative stress [3-7]. Both CyPA and CyPB trigger chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and T

lymphocytes, supporting the hypothesis that they may contribute to the guidance of leukocyte populations to inflammatory sites [3, 6-10]. We and others have demonstrated that the activities of secreted CyPA and CyPB are related to interactions with CD147 [9-11]. By using site-directed mutants of CD147, Yurchenko *et al.* [12] demonstrated that a proline residue located in an exposed loop of CD147 was crucial for CyPA to induce cell chemotaxis. Consistent with these findings, we also demonstrated that the central core of CyPB, which contains CsA binding domain and catalytic site, is required for efficient binding to T lymphocytes. Moreover, a PPIase defective mutant was found unable to trigger p44/42 mitogen-activated protein kinases (MAPK) activation and subsequent integrin-mediated adhesion of T cells to fibronectin [13,14]. These data suggest that CyPA and CyPB trigger common biological responses by a mechanism that involves prolyl isomerization of CD147, making this protein as an essential component of the membrane receptor of extracellular cyclophilins.

CD147 is a 50-60 kDa-type I transmembrane protein also known as extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) or basigin. CD147 is broadly expressed on human peripheral blood cells, endothelial cells and cultured cells, and is involved in reproduction, neural function, inflammation, tumour invasion and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection, functioning either as a signal transmitting molecule or directly as a regulator of adhesion. CD147 was proven to be responsible for the induction of expression of several matrix metalloproteinases [15,16], and to enable insertion of monocarboxylate transporters (MCT)-1 and -4 in the membrane, which facilitates import and/or export of lactate and pyruvate [17]. In addition to these functions, accumulating data have suggested that CD147 may interact with integrins. Antibodies to CD147 were reported to modulate homotypic cell aggregation [18,19] and CD147 was found to co-immunoprecipitate with  $\beta$ 1 integrins and to colocalize with these integrins in the areas of cell-cell contacts [20].

Although it is not clear yet as how these molecules share their roles in cell adhesion, recent findings suggest that another cell surface protein, CD98, may

functionally cooperate with CD147 to regulate  $\beta 1$  integrin functions [19]. Consistent with these findings, combination of covalent cross-linking, mass spectrometric protein identification and co-immunoprecipitation experiments revealed the existence of a cell surface multimeric complex, where CD147 and CD98 association plays a central organizing role [17]. CD98, also known as 4F2, is an 85 kDa-type II integral membrane protein initially characterized as a T cell activation marker [21]. It has been subsequently found covalently linked to one of at least six alternative 40 kDa-light chains, four of which have been identified as members of heterodimeric amino acid transporter family (HAT). The function of amino acid transporters is determined by the light chain, while the heavy chain is required for the functional cell surface expression and localization of the HAT complex [22,23]. As CD147, a striking feature of CD98 is the large diversity of functions in which it has been implicated, e.g. haematopoietic cell differentiation and functions, cell growth and fusion, and virus infection. As examples, CD98 has been reported to regulate osteoclast differentiation and T-lymphocyte stimulation [24,25]. The ability of antigen-presenting cells to deliver costimulatory signals to T lymphocytes cells could be blocked by antibodies to CD98 [26]. Antibodies against CD98 also inhibit the formation of cell syncytia by HIV and other viruses [27,28]. RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion of human placental cells [29]. In addition to these activities, CD98 appears to play a key role in the regulation of integrin functions. The first data came from studies showing that CD98 enhanced integrin-dependent cell aggregation and fusion [19, 30]. Physical interaction between CD98 and  $\beta 1$  integrins have been then demonstrated [31,32] and CD98 was reported to co-immunoprecipitate with  $\beta 1$  integrins in a number of different cell lines [33-35] and peripheral blood T lymphocytes [36]. Furthermore, evidence from a number of studies supports a model where CD98 regulates  $\beta 1$  integrin affinity, because cross-linking of CD98 with antibody leads directly to the activation of  $\beta 1$  integrins [25,35-37].

Based on the functional relationships between CD147, CD98 and  $\beta 1$  integrins, we thought the idea that CD98 might coordinate the responses triggered by CyPB and regulate integrin-mediated adhesion of responsive cells. In this study, we have thus examined the contribution of CD98 in CyPB-induced cell adhesion to fibronectin. To this end, we have used the responsive THP-1 promonocytic cell line [14]. Consistent with the previously published data, we first confirmed that CD147, CD98 and  $\beta 1$  integrins are associated within a functional multimolecular unit. Then, we demonstrated that the pro-adhesive activity of CyPB is dependent on the activation of protein kinase C- $\delta$  (PKC $\delta$ ), a mechanism in which CD98 plays a pivotal role.

## Materials and methods

### Antibodies and reagents

Recombinant human CyPB was produced and purified as described [38]. CyPB was detoxified on Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel (Pierce Chemicals, Rockford, IL, U.S.A). The endotoxin content of the preparation was less than 0.09 E.U./ $\mu$ g, as determined by the chromogenic *Limulus* lysate assay (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA). Human fibronectin was a gift from Dr. P. Delannoy (University of Lille, France). Mouse monoclonal antibodies to CD147 (clone HIM6), to  $\beta 1$  integrins (clone 18) and to PKC $\delta$  (clone 14) were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Mouse monoclonal antibody to the phosphorylated forms of ERK1/2 (p44/42 MAPK) (E-4) and goat polyclonal antibodies to CD98 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Mouse monoclonal antibody to human CD14 (My4) and rabbit polyclonal anti-phospho-PKC $\delta$  (Ser643) were from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) and Cell Signaling (Beverly, MA, USA), respectively. Mouse monoclonal antibodies to CD98 (clone AHN-18) and to  $\beta 1$  integrins (clone MAB2253) were from Chemicon International (Temecula, CA, USA). These antibodies were recommended as inducer of cell homotypic aggregation and efficient agent of immunoprecipitation, respectively. The blocking monoclonal mouse antibodies to integrin subunits (anti- $\alpha 2$ , - $\alpha 4$ , - $\alpha 5$ , - $\beta 1$ , - $\beta 2$ ,) were from Calbiochem (La Jolla, CA). Rabbit polyclonal anti-ERK1/2, mouse monoclonal anti-CD44 (clone A3D8), fluorescein-conjugated antibodies to mouse and goat IgG, horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG, and isotype-matched control antibodies were from Sigma Chemicals Co (St Louis, MO). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies were from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont Buckinghamshire, UK). PD98059, rottlerin and 1,25-dihydroxy-vitamine D3 were from Calbiochem (La Jolla, CA, USA), and wortmannin from Alexis Corp. (San Diego, CA, USA). Cell culture products were from Cambrex (Walkersville, MA, USA). Oligonucleotide PCR primers and siRNA duplexes were synthesized and purified by Eurogentec (Seraing, Belgium). All other chemicals, except where otherwise mentioned, were purchased from Sigma.

### Cell culture

Human promonocytic leukemia THP-1 cells (88081201; ECACC, Porton Down, Salisbury, UK) were routinely cultured in RPMI 1640 supplemented with 10 % FCS, 2 mM L-glutamine, 20  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol and 10 mM gentamycin in 5 % CO<sub>2</sub> enriched atmosphere at 37°C. To induce responsiveness to CyPB, THP-1 cells were differentiated for 72 h with 50 nM 1,25-dihydroxy-vitamine D3 [14]. Analyzing CD14 expression by flow cytometry checked efficacy of the

treatment. This protocol resulted in over 90 % differentiation and a viability > 95 % in all studies.

#### Flow cytofluorimetry analysis

Analysis was performed by incubating THP-1 cells ( $5 \times 10^5$  cells per sample) in Dulbecco's phosphate buffered saline containing 0.5% bovine serum albumin (DPBS/BSA), supplemented with the appropriate monoclonal antibodies or the respective isotype-matched control IgG for 1 h at 4°C. After washing, secondary fluorescein-conjugated antibodies (1/64) was added for another 1 h. Cells were washed twice and immediately used for analysis. Data were monitored on a Becton Dickinson flow cytofluorimeter (FACScalibur) (Mountain View, CA) and analyzed with CellQuest software.

#### Western blot analysis

Cells ( $10^6$  per sample) were washed in cold PBS and lysed in 70  $\mu$ L in 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100 (v/v), 20 % glycerol (v/v), 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche, Meylan, France) for 3 h at 4°C. The lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4°C and thereafter used for immunoblotting analysis. Proteins were separated on 10 % SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schull, Dassel, Germany). The blots were blocked for 1 h at room temperature in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Tween-20 (v/v), pH 7.6 (TBS-Tween), supplemented with 3 % BSA. Membranes were then incubated for 2 h at room temperature with the appropriate primary antibodies in TBS-Tween supplemented with 1 % BSA. After extensive washing with TBS-Tween, the immunoblotted proteins were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1 h-incubation, 1/5000) by using a chemiluminescence detection kit (ECL) (Amersham).

#### Immunoprecipitation

THP-1 cells ( $10 \times 10^6$ ) were lysed in 1 mL buffer consisting of 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 % CHAPS (w/v) and protease inhibitor cocktail, for 3 h at 4°C. After centrifugation at 10,000 g for 30 min, the supernatants were clarified by incubation with protein G-Sepharose (Amersham) and thereafter used for co-immunoprecipitation. To this end, lysates were incubated in the presence of 4  $\mu$ g of appropriate antibodies overnight at 4°C. Protein G-Sepharose was then added and the mixture was incubated for 3 h at 4°C. Beads were extensively washed in lysis buffer, and bound proteins were eluted by boiling the beads in 100  $\mu$ L of SDS-PAGE sample buffer under reducing conditions. Proteins were then separated on a SDS gel and processed as indicated above.

#### Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from  $3 \times 10^6$  cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the

instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Hœrdt, France). Reverse transcription was performed from 2  $\mu$ g of total RNA with an oligo-dT primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). PCR amplification was performed in a final volume of 25  $\mu$ L containing 2  $\mu$ L of first-strand cDNA, 0.625 U of GoTAQ Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 5  $\mu$ L of GoTAQ buffer (5 X), 0.5  $\mu$ L of deoxy-NTP (10 mM) and 0.125  $\mu$ L of primers (150  $\mu$ M). The housekeeping gene GAPDH was amplified in each sample to normalize for total mRNA input and confirm efficiency of complementary DNA synthesis. The amplification products were separated by electrophoresis in 2 % agarose gel containing ethidium bromide and analyzed. Images were acquired with the Gel Doc 2000 Image analysis apparatus and analyzed with the supplied software Quantity-One (Bio-Rad). The sequence of amplified product was confirmed by sequencing (Genoscreen, Lille, France).

#### RNA interference

Synthetic siRNA duplexes with symmetric 3'deoxythymidine overhangs were used to carry out RNA interference. A synthetic siRNA duplex (si-CD98), corresponding to the CD98 mRNA sequence 5'-UCU GAA GGA UGC AUC CUC A(TT)-3' (nucleotides 1222-1240 of human CD98 sequence, NM\_002394), was used to inhibit CD98 mRNA expression [29]. The oligonucleotide sequence was subjected to a BLAST search analysis and no significant identity to others sequences could be detected. To check the specificity of the RNA interference, a siRNA duplex (siGFP) corresponding to GFP (Green fluorescent protein) was used as a negative control: 5'-GAA CGG CAU CAA GGU GAA C(TT)-3'. THP-1 cells were transfected with 2  $\mu$ g of siRNA duplexes in serum-free medium using a Nucleofector device and corresponding kits (Amaxa Inc., Cologne, Germany), according to the manufacturer's instructions. To monitor the transfection efficacy, a fluorescein-tagged siRNA duplex was used in parallel, and the transfection rate was evaluated by FACS and found > 85 %. The cell responsiveness to CyPB was analyzed 72 h post-transfection.

#### Homotypic cell aggregation assay

Quantitative cell aggregation assay was performed essentially as described previously by Cho *et al.* [19]. Briefly, 100  $\mu$ L of RPMI 1640 medium containing THP-1 cells ( $10^6$  cells/mL) were placed in flat-bottom wells of a 96-microwell plate. An equal volume of medium with or without different concentrations of CyPB or antibody CD98-AHN-18 (2  $\mu$ g/mL) was added, and the cells were incubated at 37°C for 6 h or 18 h. Cells were then resuspended gently so as not to break the clusters, and the numbers of non-aggregated cells were counted in a haemocytometer. Percentage of cells in aggregates was determined by the following equation: % of cells in aggregates = [(total cells - free cells)/total cells] x 100. Relative levels of

aggregation were determined visually in making images of cells in culture by means of an inverted phase contrast microscope attached to a camera Pentax Z-70 (magnification x 200).

#### Cell adhesion assay

Adhesion assay was performed in 96-well microtiter plates coated with fibronectin (1  $\mu\text{g}$  per well), as described [10]. Plates were washed extensively with DPBS, and non-specific binding sites were blocked by the addition of 0.5% BSA (w/v) in DPBS for 30 min at 37°C. THP-1 cells ( $7.5 \times 10^6$  per mL) were pre-incubated in DPBS/BSA with CyPB or CD98-AHN-18 antibody for 10 min at 37°C and the mixture was then distributed into the wells (100  $\mu\text{L}$ ) for additional 20 min incubation at 37°C. Thereafter, the plates were extensively washed with DPBS to remove non-adherent cells, and the remaining firmly attached cells were fixed with 3 % formaldehyde, stained with 1 % methylene blue and lysed with HCl 0.1 N. The absorbance was measured at 590 nm with a microplate BioRad reader Model 550 (Hercules, CA). Cell adhesion was estimated by using standard curves where absorbances were related to cell numbers, and results were expressed as a percentage of the initially added cells remaining fixed to the substrate. In some experiments, cells were either pre-treated for 1 h at 37°C with metabolic inhibitors or pre-incubated for 1 h at 20°C in the presence of antibodies to CD147 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and thereafter used for adhesion assays as described above. Neutralizing antibodies were checked for their inability to induce cell responses in the absence of any stimulatory agents.

#### Statistical Analysis

Results of cell aggregation and cell adhesion assays are expressed as mean values  $\pm$  SD, and were obtained from 3 to 6 replicates culture. Statistical significance for unpaired observation between control and experimental samples was evaluated by Student's *t*-test, with a threshold of  $P < 0.05$ . In all cases, each individual experiment was repeated at least 3 times.

## Results

### CyPB and CD98-AHN-18 induce THP-1 cell homotypic aggregation

The antibody CD98-AHN-18 was previously demonstrated to be a potent inducer of homotypic aggregation of promonocytic U937 cells [19]. We then tested the ability of this antibody to induce a similar response in THP-1 cells. As expected, CD98-AHN-18 induced formation of large clusters, which could be observed from 6 h of incubation and was maximal at 18 h (Fig. 1A). As already reported by others, the effect of CD98-AHN-18 was optimal at 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and increase in the concentration of antibody above this value resulted in a lesser level of aggregation. Moreover, the effect was not due simply to the binding of antibody to the cell surface, since antibody to CD44, another adhesion molecule present on the surface of THP-1 cells, did not induce

aggregation (data not shown). CyPB was then tested for its ability to induce similar aggregation. Incubation of THP-1 cells in the presence of 50 nM of CyPB resulted in homotypic aggregation, thus mimicking the effect of CD98-AHN-18. Clustering could be observed from 6 h, although the aggregates were larger and more compact following 18 h of incubation (Fig. 1A). We then analyzed the dose-dependent responses of CyPB by using a quantitative cell aggregation assay. Although large aggregates could not be visualized by means of microscope analysis, a 40 % cell aggregation could be measured in the absence of CyPB. Formation of small aggregates might be due to spontaneous adhesion and/or clustering of THP-1 cells in culture. We then reproduced the experiments in the presence of increasing concentrations of CyPB for 6 h or 18 h of incubation. In both cases, stimulation with CyPB similarly resulted in an increase in cell aggregation. The effect was significant from 10 nM and reached a plateau thereafter, which corresponded to a 2-fold increase in cell aggregation by comparison with unstimulated THP-1 (Fig. 1B). Altogether, these results demonstrate that CyPB functions as CD98-AHN-18 antibody in the induction of homotypic aggregation, suggesting a convergence between CyPB and CD98.

### CyPB and CD98-AHN-18 induce THP-1 cell adhesion to fibronectin

In precedent experiments, we reported that CyPB induces adhesion of peripheral blood T lymphocytes by a mechanism dependent on the activation of  $\alpha 4\beta 1$  integrins [10]. We thus checked here whether CyPB induces a similar response in THP-1 cells. In the absence of CyPB, the adhesion of THP-1 cells to fibronectin was estimated at around 20 % of initially added cells, which corroborated with the ability of these cells to spontaneously form aggregates. When the experiments were reproduced in the presence of increasing concentrations of CyPB, a significant increase in cell adhesion could be observed. The optimal concentration of CyPB was estimated at around 30 nM, reflecting an almost 3-fold increase in cell adhesion compared with control (Fig. 2A). We then reproduced the experiments in the presence of blocking antibodies to integrin subunits. Cell adhesion could be only inhibited in the presence of anti- $\alpha 4$  and anti- $\beta 1$  subunit antibodies, confirming the involvement of  $\alpha 4\beta 1$  integrins in the pro-adhesive activity of CyPB (Fig. 2B). Moreover, the full inhibition obtained with either anti- $\alpha 4$  or anti- $\beta 1$  antibodies indicate that adhesion molecules other than  $\alpha 4\beta 1$  integrins were not involved in the adhesive process induced by CyPB. Interestingly, Miyamoto et al. [36] demonstrated that the same integrin heterodimer was involved in the responses induced by CD98 cross-linking. Consistent with these observations, we demonstrated here that integrin activation by CD98-AHN-18 antibody led to an increase in THP-1 cell adhesion to fibronectin, which

was quite similar to the response triggered by CyPB (Fig. 2C).

#### Activation of p44/42 MAPK is associated with CyPB- and CD98-AHN-18-induced cell adhesion

CyPB and CD98-AHN-18 antibody were both reported to activate p44/42 MAPK signalling pathway in various cell types [9,14,39]. We then analyzed the phosphorylation status of ERK1/2 in THP-1 cells stimulated in the presence of either 50 nM CyPB or 2 µg/mL CD98-AHN-18. As expected, a significant increase in the level of phosphorylated ERKs was observed after stimulation of THP-1 cells. The amount of total ERKs was not changed, confirming that CyPB or anti-CD98 antibody only induced the phosphorylation and activation of the pre-existing proteins (Fig. 3A). Time course analysis demonstrated that ERK phosphorylation reached a maximum at 5 min after stimulation. We previously determined that fully enhanced adhesion was obtained at 20 min of incubation, indicating that ERK phosphorylation occurred before integrin activation. Therefore, time-dependent responses for activating ERK phosphorylation paralleled those observed for inducing cell adhesion. To check whether both events are related, THP-1 cells were pre-treated with PD98059, a specific inhibitor of p44/42 MAPK pathway activation, and thereafter used for adhesion assays. As expected, the pro-adhesive activity of CyPB and of CD98-AHN-18 antibody was potently inhibited, confirming the involvement of ERK activation in this process (Fig. 3B).

#### CD147 is required to promote cell responses induced by CyPB and CD98-AHN-18

CD147 was previously demonstrated to act as a signalling receptor for CyPB [9,10]. We then analyzed whether it is similarly involved in the responses induced by CyPB and CD98-AHN-18 in THP-1 cells. As expected, pre-treatment of cells with anti-CD147 antibody (CD147-HIM6), but not isotype-matched control antibodies, dramatically reduced both CyPB-induced phosphorylation of ERK1/2 and subsequent adhesion of THP-1 cells to fibronectin. To a similar extent, the responses induced by CD98-AHN-18 were potently inhibited following pre-treatment with anti-CD147 antibody (Fig. 4). These data suggest that CyPB binding or CD98 cross-linking resulted in the activation of the same signalling intermediates by a mechanism involving functional participation of CD147.

Although CD98 has not been reported as a binding protein for CyPB, a possibility remains that CyPB may interact with a sequence that overlaps the epitope recognized by CD98-AHN-18, thus explaining the common responses induced by CyPB and anti-CD98 antibody. However, direct interaction between CyPB and CD98 is unlikely, since saturation of CyPB binding sites with high concentration of the protein did not reduce the binding of CD98-AHN-18 to THP-1 cells, and in the reverse experiments, pre-treatment of cells with anti-CD98 antibody did not inhibit the

surface binding of CyPB (data not shown). We then tested the possibility that CyPB may induce a physical association between CD147, CD98 and  $\beta$ 1 integrins. To this end, co-immunoprecipitation with anti- $\beta$ 1 integrin antibody was performed on protein complexes from mild detergent THP-1 cell lysates. As expected, anti- $\beta$ 1 integrin antibody immunoprecipitated  $\beta$ 1 integrins from non-stimulated and CyPB-stimulated cells. Moreover, a physical association with CD98 and CD147 could be detected, as demonstrated by immunostaining with anti-CD147 and anti-CD98 antibodies from the same immunoprecipitated complexes (Fig. 5). However, both the proteins could be co-precipitated with  $\beta$ 1 integrins in the absence of CyPB, suggesting the existence of a preformed heterocomplex. Although a small and transient increase in the intensities of CD98 and CD147 staining could be observed in the presence of CyPB, it probably resulted from stabilization of the pre-existing heterocomplex rather than an increase in the clustering between  $\beta$ 1 integrins, CD98 and CD147. To confirm this hypothesis, we analyzed the relative levels of expression of CD147, CD98 and  $\beta$ 1 integrins in whole cell lysates. As shown in Fig. 5, CD98 and CD147 were abundantly expressed on the cell membrane of THP-1 cells. However, the relative expression of CD147 and CD98 did not correlate with the amounts of the same proteins that were co-immunoprecipitated with  $\beta$ 1 integrins. Taken together, these data indicate that only minor fractions of CD98 and CD147 are closely associated to  $\beta$ 1 integrins, and that CyPB probably induced activation of this pre-existing heterocomplex. Taking into account these findings, we then explored the mechanism by which CD147-HIM6 inhibited the responses induced by CyPB. To this end, the inhibitory antibody was used in co-immunoprecipitation experiments. As expected, anti-CD147 antibody immunoprecipitated CD147 from mild-detergent lysates of THP-1 cells. However, neither CD98 nor  $\beta$ 1 integrins could be immunostained with corresponding antibodies (data not shown), indicating that CD147-HIM6 antibody probably inhibited CyPB-induced cell responses by destabilizing the pre-existing heterocomplex.

#### PKC $\delta$ activation is implicated in CyPB-induced cell responses

Cross-linking CD98 has been reported to activate PKC $\delta$ , which in turn activates p44/42 MAPK and induces cell aggregation [39]. We thus investigated the involvement of PKC $\delta$  in the responses induced by CyPB, using phosphorylation of Ser643 as an indicator of PKC activation [40]. The relative level of phosphorylated *versus* total PKC is shown in Fig. 6A. A small proportion of PKC $\delta$  was found phosphorylated even in the absence of CyPB, perhaps resulting from the involvement of this PKC isoform in other metabolic processes associated to the transformed phenotype of THP-1 cells. However, the addition of CyPB induced a transient increase in the

phosphorylation of PKC $\delta$ , which was maximal in the first few minutes of stimulation and decreased slowly thereafter. Interestingly, PKC $\delta$  activation was reported to be a downstream signalling event following phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) activation [41], and CD98 cross-linking was demonstrated to activate PI3-K [35]. We thus analyzed the effect of wortmannin, which is a potent inhibitor of PI3-K, on CyPB-induced activation of PKC $\delta$ . As expected, pre-incubation of THP-1 cells with wortmannin efficiently abolished the increase in PKC $\delta$  phosphorylation by comparison with control conducted with untreated cells (Fig. 6A).

We demonstrated above that CyPB- and CD98-AHN-18-induced adhesion of THP-1 cells is dependent on a mechanism whereby p44/42 MAPK activation is an essential signalling event. CyPB-induced ERK phosphorylation reached a maximum after 5 min of stimulation, while PKC $\delta$  phosphorylation occurred in the first minutes of activation. Therefore, PKC $\delta$  activation may be an early signalling event, which in turn mediates p44/42 MAPK activation. The relationships between PKC $\delta$  and p44/42 MAPK activation was thus investigated by analyzing the phosphorylation status of ERK1/2 in THP-1 cells treated in the presence of either wortmannin or rottlerin, the latter is a selective inhibitor of PKC $\delta$  activity. As shown in Fig. 6B, CyPB-initiated ERK phosphorylation was potentially reduced in the cells treated with both the inhibitors, indicating that CyPB induces p44/42 MAPK activation by a mechanism dependent on the upstream activation of PKC $\delta$ . We therefore investigated the relationships between PKC $\delta$  activation and cell adhesion of THP-1 cells. As expected, pre-treatment with either rottlerin or wortmannin potentially reduced the capability of CyPB to trigger cell adhesion to fibronectin. Altogether, these data indicate that early signalling events initiated by CyPB binding to cell surface mimicked the responses induced by cross-linking CD98, further supporting the hypothesis that CD98 plays a pivotal role in CyPB-induced p44/42 MAPK activation and subsequent cell adhesion.

#### **Silencing of CD98 expression inhibits the responses induced by CyPB**

Finally, we used a RNA interference approach to further explore the involvement of CD98 in the responses triggered by CyPB. Transfection of THP-1 cells with siRNA that specifically targets CD98 (si-CD98) critically reduced the expression of the corresponding mRNA. By comparison with control cells transfected with siRNA that targets GFP, the down-expression of the mRNA encoding CD98 reached 60 % 48 h post-transfection. Immunostaining of CD98 was similarly reduced in cell lysates from si-CD98-transfected cells, confirming the efficacy of RNA interference to reduce CD98 expression (Fig. 7A). Cell immunostaining of CD147 or  $\beta$ 1 integrins was not modified in transfected cells, indicating that silencing of CD98 had no inhibitory effect on the

expression of these proteins at the cell membrane (data not shown). As expected, such a reduction in the expression of CD98 resulted in a strong inhibition of CyPB-induced cell adhesion to fibronectin (Fig. 7B). When analyzing the intracellular events initiated by CyPB, we found that silencing of CD98 potentially reduced phosphorylation of PKC $\delta$  and ERK1/2 (Fig. 7C), which correlated with the inability of CyPB to induce cell adhesion. Altogether, these data further demonstrated that CD98 is a key element in the transduction signals that control the pro-adhesive activity of CyPB.

#### **Discussion**

CD98 cross-linking on the cell surface was reported to induce cell aggregation by a mechanism dependent on the participation of CD147 and  $\beta$ 1 integrins [19]. Moreover, CD147 was identified as a member of the CD98 functional unit, suggesting the existence of a cell surface multimeric heterocomplex, where CD147, CD98 and  $\beta$ 1 integrins may be associated [17]. In previous works, we demonstrated that CyPB induces adhesion of peripheral blood T lymphocytes, by a mechanism dependent on the interaction with CD147 and the activation of  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrins [10]. Interestingly, CD98 was found to co-immunoprecipitate with  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrins in peripheral blood T lymphocytes [36]. However, the role of CD98 in the responses triggered by CyPB had not yet been investigated, perhaps because of CD98 diversity and ubiquity. In the current issue, we showed that CyPB-induced adhesion of THP-1 cells is also dependent on the interaction with CD147 and activation of  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrins. We then demonstrated that cross-linking CD98 with CD98-AHN-18 mimicked the responses induced by CyPB, while reducing the expression of CD98 by RNA interference rendered the cells non-responsive to the pro-adhesive factor. Altogether, these data suggest that CD98 may play a pivotal role in the responses induced by CyPB.

One central question in the biology of CD98 was to understand the nature of its interactions with integrins at the cell surface. The physical interaction between CD98 and  $\beta$ 1 integrins was first evaluated by analyzing either the binding of endogenous CD98 to genetically engineered regions of  $\beta$ 1 integrins in affinity chromatography, or by utilizing a model of CHO cells expressing various genetic constructs of  $\beta$ 1 integrins and CD98 domains. These experiments demonstrated that the transmembrane and cytoplasmic domains of CD98 were implicated in mediating the interaction with  $\beta$ 1 cytoplasmic tail, while the extracellular domain of CD98 is important for amino acid transport function [31,32]. However, accumulating data were consistent with a model whereby CD98 might be implicated in the regulation of  $\beta$ 1 integrin affinity, suggesting that the association between CD98 and  $\beta$ 1 integrins may not rely on proximity alone but involve conformational changes and/or signalling events [19,25,36,37]. These

observations were first confirmed by examination of CD98-induced signalling. CD98 cross-linking by CD98-AHN-18 induced membrane translocation of PKC $\delta$ , but not other PKC isoforms, and phosphorylation of p44/42 MAPK. Activation of these signalling molecules could be the mechanism by which CD98 functionally interacts with  $\beta$ 1 integrins, because CD98-induced cell aggregation was inhibited in the presence of PD98059 and rottlerin [39]. Utilization of chimeric or truncation mutants of CD98 further demonstrated that both the transmembrane and the proximal part of the cytoplasmic domain of CD98 were required to enhance integrin affinity. PI3-K activation was then suggested to be the early mechanism by which CD98 interacts with  $\beta$ 1 integrin tail, resulting in enhancement in integrin functions [42]. Consistent with the abundant literature implicating CD98 in integrin functions, our results confirm and support the idea that CD98 does not only physically interact with  $\beta$ 1 integrins, but also participates in the activation of signalling molecules, which in turn enhances integrin functions. First, we showed that PD98059 strongly inhibited integrin-mediated adhesion of THP-1 cells, confirming the role of p44/42 MAPK activation in the pro-adhesive activity of CyPB. We then demonstrated that CyPB-induced ERK phosphorylation and subsequent adhesion of THP-1 cells could be inhibited by rottlerin and wortmannin, indicating that p44/42 MAPK activation is a downstream event following PKC $\delta$  and PI3-K activation. Finally, we found that reduction in CD98 expression by siRNA suppressed CyPB-induced activation of PKC $\delta$  and p44/42 MAPK, while cross-linking CD98 by CD98-AHN-18 mimicked the signalling events triggered by CyPB.

The signalling pathway involved in the activation of ERK has been intensively studied, and the mechanism of activation by Ras has been analyzed in detail. However, accumulating data have suggested the involvement of PKC in the signalling pathway leading to p44/42 MAPK activation. Interestingly, PKC $\delta$  requirement appears to be agonist- and cell type-specific. As example, fibroblast growth factor (FGF) activates p44/42 MAPK in neuronal cells by a mechanism dependent on PKC $\delta$ . Conversely, FGF-induced ERK phosphorylation was found independent on PKC $\delta$  in fibroblasts [43]. In other experiments, the use of knockout mutants and mutants with constitutive kinase activity demonstrated that the activation of PKC $\delta$  was sufficient to activate p44/42 MAPK by a mechanism independent of Ras [44]. Consistent with these data, our results suggest that PKC $\delta$  may be a pivotal element in the activation of p44/42 MAPK by CyPB. Activation and regulation of PKC $\delta$  can involve binding of diacylglycerol, serine/threonine and/or tyrosine phosphorylation, and interaction with scaffolding molecules that promote enzyme/substrate interaction [45]. However, CD98-dependent activation of PKC $\delta$  has been reported to be independent of diacylglycerol, and tyrosine phosphorylation would be involved in inhibition

rather than activation of PKC $\delta$  [39]. Ser643 has been previously reported to be a site of autophosphorylation, which may play an important role in controlling enzymatic activity and biological function of PKC $\delta$  [40]. In the present paper, we demonstrated that CyPB induced phosphorylation of PKC $\delta$  on Ser643 and that such a phosphorylation could be inhibited by wortmannin. These findings indicate that PKC $\delta$  activation requires participation of an upstream signalling molecule implicating PI3-K activation. Therefore, autophosphorylation of PKC $\delta$  on Ser643 might be consequent upon a direct interaction with PI3-K. Another possible signalling intermediate may be 3-phospho-inositide dependent kinase 1 (PDK1). PDK1 indeed acts downstream of PI3-K and has been reported to interact with and activate members of the PKC family [41]. Additional studies into the signalling pathways from CD147/CD98 complex are required to further determine the mechanism of activation of PKC $\delta$  and the possible role of PDK1 as a signalling intermediate in CyPB-induced cell responses.

Finally, we demonstrated that CyPB did not directly interact with CD98, and did not induce any significant increase in the intensity of the complex formed by CD147, CD98 and  $\beta$ 1 integrins. Moreover, silencing of CD98 did not modify the level of expression of CD147. Surprisingly, Xu & Hemler [17] reported that reduction of the expression of either CD147 or CD98 by siRNA reciprocally resulted in a loss of each other at the cell surface of polarized cells. However, we found that only a minor fraction of CD147 was immunoprecipitated with anti- $\beta$ 1 integrin antibody, suggesting that the expression of CD147 is unlikely to be dependent on CD98 in non-polarized cells. Alternatively, anti-CD147 antibodies were reported to inhibit cell homotypic aggregation induced by CD98 cross-linking [19]. In our hands, anti-CD147 antibody also inhibited ERK phosphorylation and cell adhesion induced by either stimulation with CyPB or CD98-AHN-18, suggesting that inhibition was due to dissociation of CD147 from a pre-existing heterocomplex. In support to this hypothesis, we found that immunoprecipitation with the same anti-CD147 antibody did not allow to co-precipitate either CD98 or  $\beta$ 1 integrins. Altogether, these results suggest that the responses induced by CyPB are dependent on the activation rather than oligomerization of a heterocomplex. Actually, the close association between CD147 and CD98 may provide a mechanism whereby CD98 initiates signalling events as a consequence on the functional interaction with CyPB-activated CD147. We and others previously demonstrated that prolyl-isomerization of CD147 might be the mechanism by which cyclophilins induces cell responses. Defective PPIase cyclophilin mutants failed to activate p44/42 MAPK and to induce cell adhesion [13,14], and Pro<sup>180</sup> and Gly<sup>181</sup> residues in the extracellular loop of CD147 were found to be critical for inducing signalling events [12]. Although no direct mechanistic evidence

could be provided, we hypothesized for a model whereby CyPB-mediated prolyl-isomerization of CD147 may induce conformational changes within the polypeptidic chain of CD98, which in turn lead to the association with and subsequent activation of signalling molecules that enhance integrin-mediated functions.

Growing evidence has suggested a role for secreted CyPA and CyPB in inflammation and viral infection [3-11]. The up-regulation of CD147 expression in the synovial membrane was found to correlate with MMP overexpression, which plays an essential role in cartilage lesion development in rheumatoid arthritis [46]. High levels of CyPA within synovial fluids were found to directly correlate with the severity of rheumatoid arthritis [47], and anti-CD147 antibodies or CD147 antagonistic peptides were reported to efficiently block the migration of monocytes/macrophages to synovial fluids of the patients [48]. Moreover, blocking cyclophilin/CD147 interactions with anti-CD147 antibodies or non-immunosuppressive cyclosporin analogues was demonstrated to reduce inflammatory responses in mouse models of acute lung inflammation [6] and asthma [7]. On another hand, cyclophilin interaction with CD147 has been demonstrated to play a role in HIV-1 infection and to contribute to AIDS

pathogenesis [11]. CD98 has been also implicated in the physiopathology of HIV-1 [49]. Actually, syncytium formation and subsequent cell fusion are potentially important mechanisms of virus-induced cytotoxic effects. Interestingly, CD98 was reported to regulate virus-mediated cell fusion in a manner dependent on its association with CD147 [50]. Therefore, initial interaction with CD147 might promote attachment of the virus to target cells and contribute to the functional interaction with CD98, which in turn leads to cell activation and syncytium formation. With regards to the possible role of cyclophilins in the development and/or progression of inflammatory pathologies and viral infection, detailed analysis of the interaction of cyclophilins with CD147 and elucidation of the signalling pathways dependent on its close association with CD98 would then provide opportunity to develop therapeutic molecules capable of blocking pathogenic conditions that depend on CD147/CD98 association.

#### Acknowledgements

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

#### REFERENCES

- [1] R.E. Handschumacher, M.W. Harding, J. Rice, R.J. Drugge, D.W. Speicher, Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226 (1984) 544-547.
- [2] A. Galat, Peptidylprolyl *cis/trans* isomerases (immunophilins): biological diversity-targets-functions. *Curr. Top. Med. Chem.* 3 (2003) 1315-1347.
- [3] B. Sherry, N. Yarlett, A. Strupp, A. Cerami, Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 3511-3515.
- [4] I. Tegeder, A. Schumacher, S. John, H. Geiger, G. Geisslinger, H. Bang, K. Brune, Elevated serum cyclophilins levels in patients with severe sepsis. *J. Clinical Immunol.* 17 (1997) 380-386.
- [5] Z.G. Jin, M.G. Melaragno, D.F. Liao, C. Yan, J. Haendeler, Y.A. Suh, J.D. Lambeth, B.C. Berk, Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ. Res.* 87 (2000) 789-796.
- [6] K. Arora, W.M. Gwinn, M.A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H.R. MacDonald, M.I. Bukrinsky, S.I. Constant, Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J. Immunol.* 175 (2005) 517-522.
- [7] W.M. Gwinn, J.M. Damsker, R. Falahati, I. Okwumabua, A. Kelly-Welch, A.D. Keegan, C. Vanpouille, J.J. Lee, L.A. Dent, D. Leitenberg, M.I. Bukrinsky, S.L. Constant, Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J. Immunol.* 177 (2006) 4870-4879.
- [8] Q., Xu, M.C. Leiva, S.A. Fischkoff, R.E. Handschumacher, C.R. Lyttle, Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 11968-11971.
- [9] V. Yurchenko, M. O'Connor, W.W. Dai, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, M. Bukrinsky, CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2001) 786-788.
- [10] F. Allain, C. Vanpouille, M. Carpentier, M.C. Slomianny, S. Durieux, G. Spik, 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 (2002) 2714-2719.
- [11] T. Pushkarsky, G. Zybarth, L. Dubrovsky, V. Yurchenko, H. Tang, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, M. Bukrinsky, CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 6360-6365.
- [12] V. Yurchenko, G. Zybarth, M. O'Connor, W.W. Dai, G. Franchin, T. Hao, H. Guo, H.C. Hung, B. Toole, P. Gallay, B. Sherry, M. Bukrinsky, Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22959-22965.
- [13] M. Carpentier, F. Allain, M.C. Slomianny, S. Durieux, C. Vanpouille, B. Haendler, G. Spik, 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 (2002) 5222-5229.



- [14] R. Pakula, A. Melchior, A. Denys, C. Vanpouille, J. Mazurier, F. Allain, Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* (2007) 492-503.
- [15] C. Biswas, Y. Zhang, R. DeCastro, H. Guo, T. Nakamura, H. Kataoka, K. Nabeshima, The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* 55 (1995) 434-439.
- [16] B.P. Toole, Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. *Curr. Top Dev. Biol.* 54 (2003) 371-389.
- [17] D. Xu, M. Hemler, Metabolic activation-related CD147-CD98 complex. *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) 1061-1071.
- [18] W. Kasinrerker, N. Tokrasinwit, P. Phunpae, CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. *Immunology* 96 (1999) 184-192.
- [19] J.Y. Cho, D.A. Fox, V. Horejsi, K. Sagawa, K.M. Skubitz, D.R. Katz, B. Chain, B. The functional interactions between CD98,  $\beta$ 1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* 98 (2001) 374-382.
- [20] F. Berditchevski, S. Chang, J. Bodorova, M.E. Hemler, Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29174-29180.
- [21] B.F. Haynes, M.E. Hemler, D.L. Mann, G.S. Eisenbarth, J. Shelhamer, H.S. Mostowski, C.A. Thomas, J.L. Strominger, A.S. Fauci, Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J. Immunol.* 126 (1981) 1409-1414.
- [22] E. Nakamura, M. Sato, H. Yang, F. Miyagawa, M. Harasaki, K. Tomita, S. Matsuoka, A. Noma, K. Iwai, N. Minato, 4F2 CD98 heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 3009-3016.
- [23] F. Verrey, D.L. Jack, I.T. Paulsen, Jr M.H. Saier, R. Pfeiffer, New glycoprotein-associated protein amino acid transporters. *J. Membr. Biol.* 172 (1999) 181-192.
- [24] Y. Higuchi, M. Ito, M. Tajima, S. Higuchi, N. Miyamoto, M. Nishio, M. Kawano, S. Kusagawa, M. Tsurudome, A. Sudo, K. Katou, A. Uchida, Y. Ito, Gene expression during osteoclast-like cell formation induced by antifusion regulatory protein-1/CD98/4F2 monoclonal antibodies (Mabs): c-src is selectively induced by anti-FRP-1 Mab. *Bone* 25 (1999) 17-24.
- [25] A.P. Warren, K. Patel, Y. Miyamoto, J.N. Wygant, D.G. Woodside, B.W. McIntyre, Convergence between CD98 and integrin-mediated T-lymphocyte co-stimulation. *Immunology* 99 (2000) 62-68.
- [26] V.E. Woodhead, T.J. Stonehouse, M.H. Binks, K. Speidel, D.A. Fox, A. Gaya, D. Hardie, A.J. Henniker, V. Horejsi, K. Sagawa, K.M. Skubitz, H. Taskov, R.F. Todd, A. van Agthoven, D.R. Katz, B.M. Chain, Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation. *Int. Immunol.* 12 (2000) 1051-1061.
- [27] S. Ohgimoto, N. Tabata, S. Suga, M. Tsurudome, M. Kawano, M. Nishio, K. Okamoto, H. Komada, N. Watanabe, Y. Ito, Regulation of human immunodeficiency virus gp160-mediated cell fusion by antibodies against fusion regulatory protein 1. *J. Gen. Virol.* 77 (1996) 2747-2756.
- [28] K. Okamoto, M. Tsurudome, S. Ohgimoto, M. Kawano, M. Nishio, H. Komada, M. Ito, Y. Sakakura, Y. Ito, An anti-fusion regulatory protein-1 monoclonal antibody suppresses human parainfluenza virus type 2-induced cell fusion. *J. Gen. Virol.* 78 (1997) 83-89.
- [29] Y. Kudo, C.A.R. Boyd, RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialization of human placental BeWo cells. *FEBS Lett.* 577 (2004) 473-477.
- [30] N. Tabata, M. Ito, K. Shimokata, S. Suga, S. Ohgimoto, M. Tsurudome, M. Kawano, H. Matsumura, H. Komada, M. Nishio, Y. Ito, Expression of fusion regulatory proteins (FRPs) on human peripheral blood monocytes. Induction of homotypic cell aggregation and formation of multinucleated giant cells by anti-FRP-1 monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 153 (1994) 3256-3266.
- [31] R. Zent, C.A. Fenczik, D.A. Calderwood, S. Liu, M. Dellos, M.H. Ginsberg, Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin  $\beta$  cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 5059-5064.
- [32] C.A. Fenczik, R. Zent, M. Dellos, D.A. Calderwood, J. Satriano, C. Kelly, M.H. Ginsberg, Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 8746-8752.
- [33] T.V. Kolesnikova, B.A. Mannion, F. Berditchevski, M.E. Hemler,  $\beta$ 1 integrins show specific association with CD98 protein in low density membranes. *BMC Biochem.* 2 (2001) 10.
- [34] D. Merlin, S. Sitaraman, X. Liu, K. Eastburn, J. Sun, T. Kucharzik, B. Lewis, J.L. Madara, CD98-mediated links between amino acid transport and  $\beta$ 1 integrin distribution in polarized columnar epithelia. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39282-39289.
- [35] R.C. Rintoul, R.C. Buttery, A.C. Mackinnon, W.S. Wong, D. Mosher, C. Haslett, T. Sethi, Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth. *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 2841-2852.

- [36] Y. Miyamoto, J.S. Mitchell, B.W. McIntyre, Physical association and functional interaction between  $\beta 1$  integrin and CD98 on human T lymphocytes. *Mol. Immunol.* 39 (2003) 739-751.
- [37] C.A. Fenczik, T. Sethi, J.W. Ramos, P.E. Hughes, M.H. Ginsberg, Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature* 390 (1997) 81-85.
- [38] G. Spik, B. Haendler, O. Delmas, C. Mariller, M. Chamoux, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil, K. Stedman, H.P. Kocher, R. Keller, P.C. Hiestand, N.R. Movva, A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10735-10738.
- [39] J.Y. Cho, K.M. Skubitz, D.R. Katz, B.M. Chain, CD98-dependent homotypic aggregation is associated with translocation of protein kinase C $\delta$  and activation of mitogen-activated protein kinases. *Exp. Cell Res.* 286 (2003) 1-11.
- [40] W. Li, J. Zhang, D.P. Bottaro, J.H. Pierce, Identification of serine 643 of protein kinase C- $\delta$  as an important autophosphorylation site for its enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24550-24555.
- [41] J.A. Le Good, W.H. Ziegler, D.B. Parekh, D.R. Alessi, P. Cohen, P.J. Parker, Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281 (1998) 2042-2045.
- [42] S. Cai, N. Bulus, P.M. Fonseca-Siesser, D. Chen, S.K. Hanks, A. Pozzi, R. Zent, CD98 modulates integrin  $\beta 1$  function in polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* 118 (2005) 889-899.
- [43] K.C. Corbit, D.A. Foster, M.R. Rosner, Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 4209-4218.
- [44] Y. Ueda, S.I. Hirai, S.I. Osada, A. Suzuki, K. Mizuno, S. Ohno, Protein kinase C  $\delta$  activates the MEK-ERK pathways in a manner independent of Ras and dependent of Raf. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 23512-23519.
- [45] M. Gschwendt, Protein kinase C delta. *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 555-564.
- [46] T. Tomita, T. Nakase, M. Kaneko, K. Shi, K. Takahi, T. Ochi, H. Yoshikawa, Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, (2002) 373-378.
- [47] A. Billich, G. Winkler, H. Aschauer, A. Rot, P. Peichl, Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 185 (1997) 975-980.
- [48] P. Zhu, J. Ding, J. Zhou, W.J. Dong, C.M. Fan, Z.N. Chen, Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production. *Arthritis Res. Ther.* 7 (2005) 1023-1033.
- [49] M. Tsurudome, Y. Ito, Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells. *Crit. Rev. Immunol.* 20 (2000) 167-196.
- [50] K. Mori, M. Nishimura, M. Tsurudome, M. Ito, M. Nishio, M. Kawano, Y. Kozuka, Y. Yamashita, H. Komada, A. Uchida, Y. Ito, The functional interaction between CD98 and CD147 in regulation of virus-induced cell fusion and osteoclast formation. *Med. Microbiol. Immunol.* 193 (2004) 155-162.

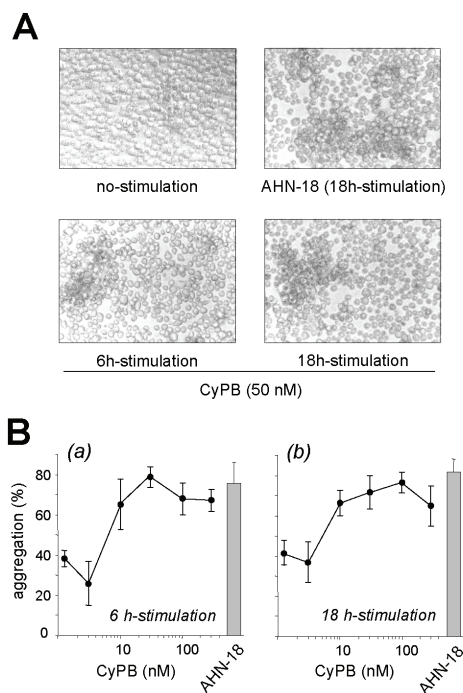


Fig. 1 - Effect of CyPB and CD98-AHN-18 antibody on homotypic aggregation of THP-1 cells. (A) Differentiated THP-1 cells were incubated in the presence of CD98-AHN-18 antibody (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or CyPB at the concentration of 50 nM for the indicated times. Images of cells in culture at these time points were obtained by means of an inverted phase contrast microscope (original magnification, x 200). Results show aggregation from triplicate culture and are representative from at least three separate experiments (B) Dose dependency of aggregation was analyzed by incubating THP-1 cells in the presence of increasing concentrations of CyPB for 6 h (a) and 18 h (b). In both cases, cell aggregation induced by CD98-AHN-18 at 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was also shown. Aggregation was measured as described in "Materials & Methods". Points are means  $\pm$  SD of triplicate determination and are representative of three separate experiments.

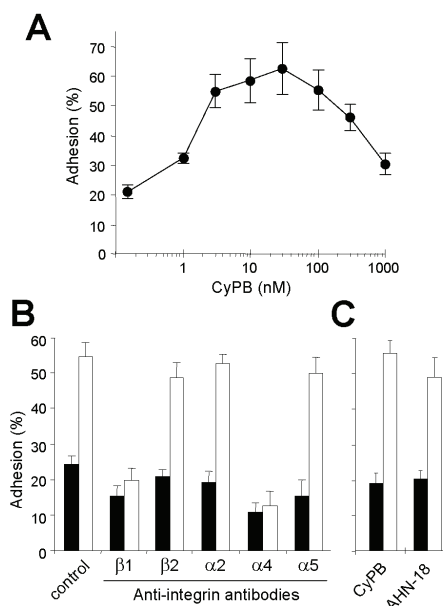


Fig. 2 - Effect of CyPB and CD98-AHN-18 antibody on the adhesion of THP-1 cells to fibronectin. (A) Differentiated THP-1 cells were pre-incubated in the absence or presence of increasing concentrations of CyPB for 20 min at 37°C, and thereafter allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Points are means  $\pm$  SD of triplicate determination for an individual experiment. Results are expressed as percentages of initially added cells ( $0.75 \times 10^6$  per well) remaining associated to the coated well, and are representative of three separate experiments. (B) Following pre-treatment or not in the presence of antibody to integrin subunits, THP-1 cells were either untreated (filled bar) or treated with 50 nM CyPB (open bar) and used for adhesion assay. (C) THP-1 were stimulated (open bar) or not (filled bar) in the presence of either CyPB (50 nM) or CD98-AHN-18 antibody (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and thereafter used for analysis of cell adhesion to fibronectin. Each bar of histograms represents the mean  $\pm$  SD of triplicate determination of an individual experiment. Data are representative of at least three separate experiments conducted with distinct preparations of differentiated THP-1 cells.

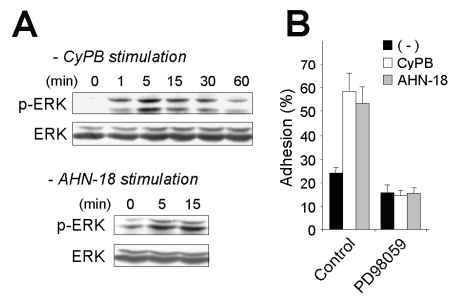


Fig. 3 - Involvement of p44/42 MAPK in CyPB- and CD98-AHN-18 antibody-induced adhesion of THP-1 cells. (A) Differentiated THP-1 cells were stimulated or not in the presence of either CyPB (50 nM) or CD98-AHN-18 antibody (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and the activation of p44/42 MAPK was analyzed by using antibodies to phosphorylated ERK1/2 (p-ERK). Parallel immunoblotting with anti-total ERKs confirmed equal loading of samples. (B) Following pre-treatment or not in the presence of PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ), THP-1 cells were incubated in the absence (filled bar) or the presence of CyPB (50 nM) (open bar) or CD98-AHN-18 antibody (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (grey bar), and then allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Results of adhesion assays are expressed as percentages of initially added cells ( $0.75 \times 10^6$  per well) remaining associated to the coated well. Each bar of histograms represents the mean  $\pm$  SD of triplicate determination of an individual experiment. Data are representative of at least three separate experiments.

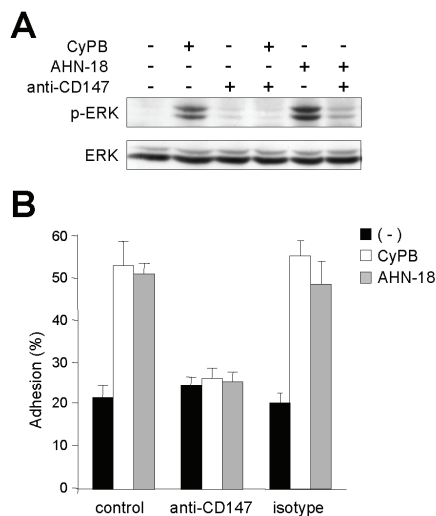


Fig. 4 - Implication of CD147 in the responses induced by CyPB and CD98-AHN-18 antibody. (A) Differentiated THP-1 cells were pre-incubated in the presence or absence of antibody to CD147, and the phosphorylation status of ERK1/2 was analyzed after a 5-min stimulation with CyPB at 50 nM or CD98-AHN-18 antibody at 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Parallel immunoblotting with anti-total ERKs confirmed equal loading of samples. (B) Following pre-incubation in the presence of anti-CD147 or isotype-matched control antibodies, THP-1 cells were either non stimulated (filled bar), or stimulated with 50 nM CyPB (open bar) or 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD98-AHN-18 antibody (grey bar), and then allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Results of adhesion assay are expressed as percentages of initially added cells ( $0.75 \times 10^6$  per well) remaining associated to the coated well. Each bar of histograms represents the mean  $\pm$  SD of triplicate determination of an individual experiment. Data are representative of at least three separate experiments.

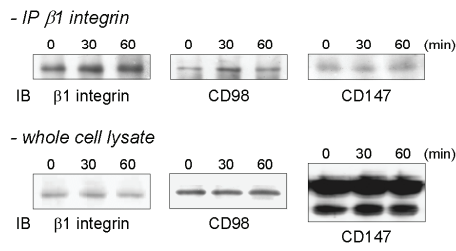


Fig. 5 - Co-immunoprecipitation of CD98 and CD147 with  $\beta 1$  integrins. Differentiated THP-1 cells were stimulated in presence of 50 nM CyPB for the indicated times. Following treatment with mild-detergent lysis buffer, equal amount of cell lysates (equivalent to  $10 \times 10^6$  cells) were immunoprecipitated with anti- $\beta 1$  integrin antibody (clone MAB2253). The immunoprecipitates were separated by 10 % SDS-PAGE and transblotted onto nitrocellulose. Membranes were subsequently immunostained with antibodies to  $\beta 1$  integrins, CD98 and CD147 (upper panels). In parallel experiments, equal amount of proteins from whole cell lysates (equivalent to  $10^6$  cells per sample) were separated by SDS-PAGE, transblotted onto nitrocellulose, and  $\beta 1$  integrins, CD98 and CD147 were immunostained with appropriate antibodies (lower panels). The blots are representative of three individual experiments.

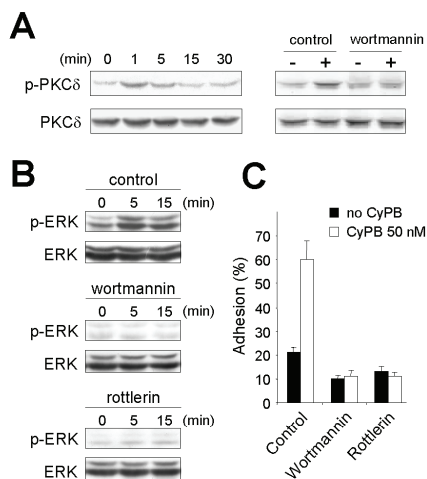


Fig. 6 - Activation of PKC $\delta$  in CyPB-stimulated THP-1 cells. (A) Left panel: differentiated THP-1 cells were stimulated or not in the presence of CyPB at 50 nM, and the rate of activation of PKC $\delta$  was analyzed by using antibodies to the phosphorylated form of PKC $\delta$  on Ser643. Parallel immunoblotting with anti-total PKC $\delta$  confirmed equal loading of samples. Right panel: following pre-treatment or not in the presence of wortmannin (50  $\mu$ M), THP-1 cells were incubated in the absence (-) or presence (+) of CyPB (50 nM), and the phosphorylation status of PKC $\delta$  was analyzed (B) THP-1 cells were pre-treated or not with wortmannin (50  $\mu$ M) or rottlerin (10  $\mu$ M), and CyPB-induced activation of p44/42 MAPK was analyzed at the indicated times. (C) Following pre-treatment or not in the presence of wortmannin (50  $\mu$ M) or rottlerin (10  $\mu$ M), THP-1 cells were incubated in the absence (filled bar) or the presence of CyPB at 50 nM (open bar), and then allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Each bar of histograms represents the mean  $\pm$  SD of triplicate determination of an individual experiment. Data are representative of at least three separate experiments.

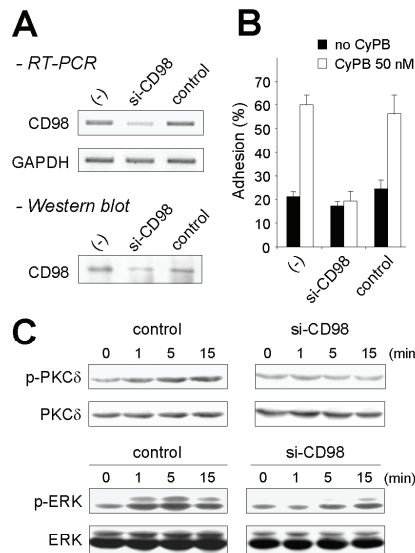


Fig. 7 - Inhibitory effect of RNA interference-induced reduction in CD98 expression on CyPB-induced cell responses. Differentiated THP-1 cells were either non-transfected (-) or transfected with siRNA that specifically target mRNA encoding either CD98 (si-CD98) or GFP (control). (A) The expression of mRNA encoding CD98 was analyzed by semi-quantitative RT-PCR 48 h post-transfection. GAPDH mRNA was also determined to normalize for input of total RNA. Following separation of the proteins of THP-1 cell lysates by SDS-PAGE, the expression of CD98 in non-transfected cells *versus* siRNA-transfected cells was analysed by Western blot 72 h post-transfection (B) Adhesion of non transfected and siRNA-transfected THP-1 cells to fibronectin was analyzed 72 h post-transfection in the absence (filled bars) or presence of 50 nM CyPB (open bar). Each bar of histograms represents mean  $\pm$  SD of triplicate. (C) Transfected THP-1 cells (72 h post-transfection) were stimulated or not in the presence of 50 nM CyPB for various times and the activation of PKC $\delta$  and p44/42 MAPK was analyzed by using antibodies to phosphorylated forms of the kinases. Parallel immunoblotting with anti-total PKC $\delta$  and ERKs confirmed equal loading of samples. Representative results from 3 independent experiments are shown.

L'adhérence des lymphocytes T par un mécanisme dépendant de l'activation des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$  est induite par la fixation de la CyPB sur son récepteur composé du syndécan-1 et du CD147. Cette activité est inhibée par un anticorps anti-CD147 (Allain *et al.*, 2002 ; Pakula *et al.*, 2007). Plusieurs données suggèrent la participation du CD147 aux phénomènes d'adhérence notamment par son association à un complexe de signalisation composé du CD98 et des intégrines  $\beta 1$  (Miyamoto *et al.*, 2003 ; Xu & Hemler, 2005, Cho *et al.*, 2001). Nous nous sommes intéressés à l'éventuelle participation du CD98 dans l'activité pro-adhésive de la CyPB. Nous avons comparé différentes réponses cellulaires induites par la CyPB ou par un anticorps anti-CD98 activateur (AHN-18) connu pour activer les intégrines  $\beta 1$ , en utilisant comme modèle les cellules THP1 différenciées en macrophages. Ces travaux démontrent que la CyPB comme l'anticorps AHN-18 induisent des réponses similaires au niveau de l'activation de la voie MAPK, de l'agrégation et de l'adhérence cellulaires. Pour les deux ligands, les réponses sont inhibées par l'utilisation d'un anticorps anti-CD147, mettant en évidence le CD147 comme point commun de la signalisation induite par ces molécules.

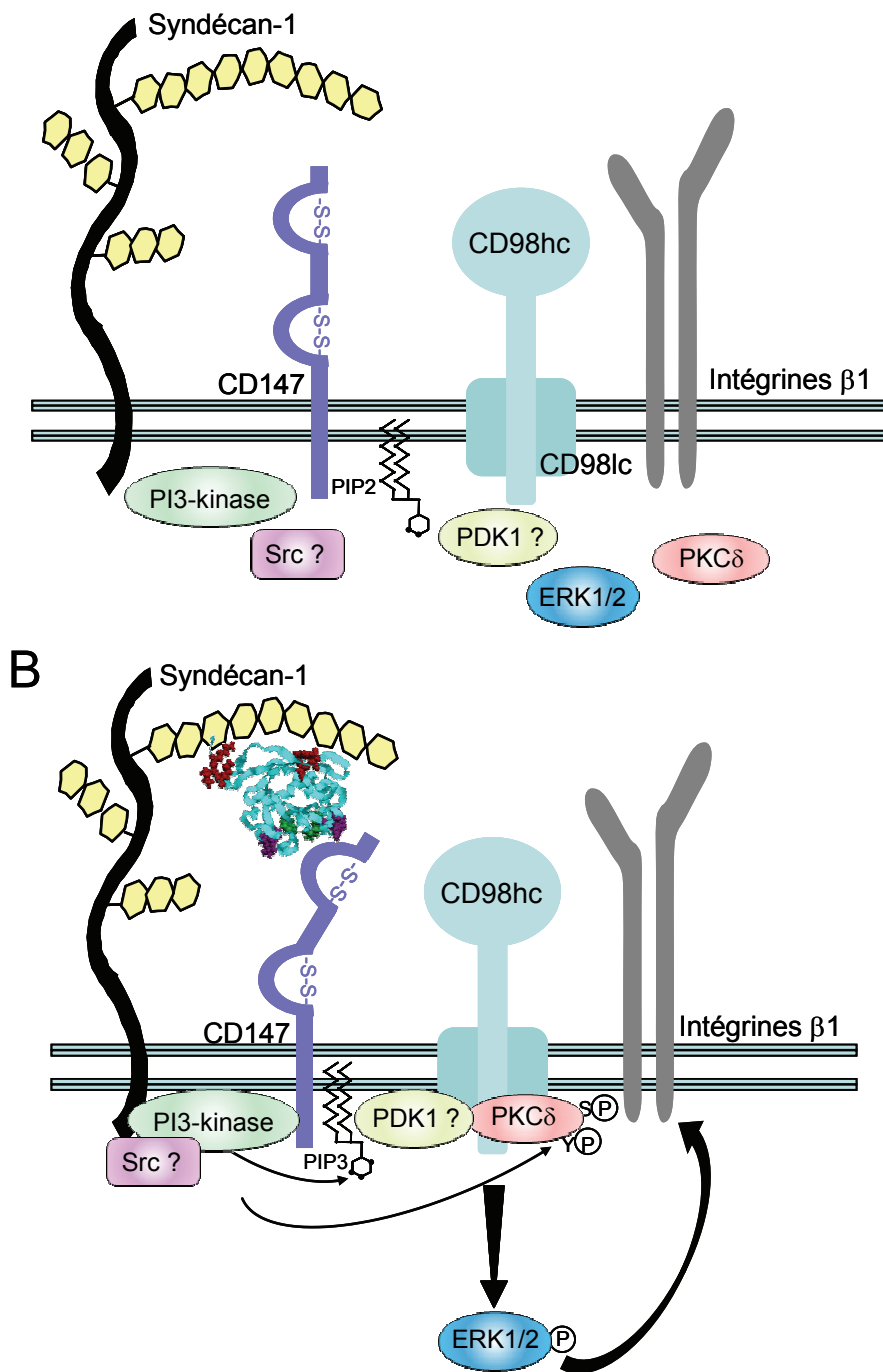
La nature du récepteur protéique de la CyPB reste non identifiée à l'exception du CD147 qui est considéré comme unité de signalisation. L'interaction est du type enzyme/substrat et non ligand/récepteur. En effet, la proline 180 du CD147 est isomérisée par la CyPB, ce qui induirait une modification conformationnelle du récepteur à l'origine de l'activation de voies de signalisation. Les similitudes observées pour le CD98 et la CyPB laissent penser que la CyPB pourrait être le ligand naturel du CD98 encore inconnu à ce jour. Malheureusement, les expériences de compétition de fixation ou d'endocytose du récepteur de la CyPB ont infirmé cette hypothèse.

L'importance du CD98 dans l'induction de la voie MAPK et de l'adhérence induite par la CyPB a été confirmée par l'utilisation de siRNA dirigé contre le CD98. Les données bibliographiques et nos résultats d'immunoprécipitation démontrent une interaction fonctionnelle entre le CD147, le CD98 et les intégrines  $\beta 1$ . Ce complexe activé par la CyPB serait à l'origine de l'activation de la voie MAPK menant à l'adhérence cellulaire. Les travaux de Cho *et al.* (2003) montrent que l'agrégation cellulaire induite par l'anticorps anti-CD98 est sensible à la rottlerine, un inhibiteur spécifique de la PKC $\delta$ . Nos travaux démontrent que l'activation de la voie MAPK par la CyPB nécessite également l'activation préalable de la PKC $\delta$  et de PI-3K. La voie de signalisation à l'origine de l'activation des MAPK a été largement étudiée, mettant en évidence l'importance de Ras. Néanmoins, les travaux de Ueda *et al.* (1996) ont montré que la PKC $\delta$  pouvait activer ces kinases

indépendamment de Ras, et que la PKC $\delta$  est suffisante pour activer les MAPK dans certaines cellules. Ainsi, le FGF-2 induit l'activation des MAPK grâce à la PKC $\delta$  dans les neurones mais pas dans les fibroblastes. La PI-3K activerait la PKC $\delta$  soit directement ou soit par l'intermédiaire de la PDK1 (*Phosphoinostide Dependant Kinase 1*), une kinase dont l'activation est dépendante des PI-3K (Corbit *et al.*, 1999 ; Gschwendt, 1999 ; Le Good *et al.*, 1998) (figure17).

En conclusion, les travaux réalisés sur l'adhérence cellulaire induite par la CyPB suggèrent que dans le complexe membranaire, le syndécan-1 et le CD147 sont à l'origine d'un signal nécessaire à l'activation du CD98, qui a son tour permet l'activation de la PKC $\delta$  et des intégrines. Toutefois, l'organisation membranaire du complexe reste à élucider. Il pourrait s'agir d'un macro-complexe préformé comprenant les 4 éléments décrits (syndécan-1, CD147, CD98 et intégrines). A l'inverse, la formation du complexe pourrait être dynamique et consécutive à la fixation de la CyPB sur ses sites HS. En effet, les syndécans et les complexes CD98/intégrines sont présents dans les rafts qui sont zones à faible densité soumises aux réorganisations de la membrane (Tkachenko & Simons, 2002 ; Kolesnikova *et al.*, 2001). De plus, les syndécans et le CD147 ont été décrits pour leur capacité à former des « clusters » membranaires (Oh *et al.*, 1997 ; Toole, 2003), et l'activation des intégrines conduit au réarrangement du cytosquelette et à la formation des plaques focales d'adhérence, ce qui traduit un phénomène de polarisation de la membrane. L'ensemble de ces données suggère que la CyPB, par sa fixation sur le syndécan-1 pourrait induire un signal à l'origine d'un phénomène de rapprochement entre le protéoglycane et le CD147, menant à l'activation et à la stabilisation du complexe récepteur. Cette hypothèse expliquerait l'augmentation transitoire du complexe syndécan/CD147 visualisé dans nos expériences de retard sur gel, ce qui implique que la fluidité de la membrane est un élément clé dans l'activité pro-adhésive de la CyPB.





**Figure 17 :** Schéma représentant le complexe multimoléculaire impliqué dans l'activité pro-adhésive de la CyPB.

A) En absence de ligand, les molécules de signalisation potentiellement impliquées sont non activées. B) La fixation de la CyPB sur les chaînes HS du syndécan-1 induit l'isomérisation *cis/trans* d'une liaison prolyle du CD147, ce qui peut entraîner des changements de conformation au niveau du CD98. La PI3-kinase peut alors phosphoryler le PIP2 pour recruter la PDK1, qui peut être impliquée dans la phosphorylation de résidus de sérine de la PKC $\delta$ . Simultanément, une Src kinase pourrait phosphoryler un résidu tyrosine de la PKC $\delta$ . Dès lors, la PKC $\delta$  activée est recrutée à la membrane et active les protéines ERK1/2. Cette cascade de signalisation aboutit à l'activation des intégrines  $\beta$ 1 impliquées dans l'activité pro-adhésive de la CyPB.

# Partie II

*Mise en évidence de  
l'activité immunorégulatrice de la CyPB*

Composant principal de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, le LPS est un glycolipide complexe formé d'un motif polysaccharidique hydrophile et d'un domaine hydrophobe appelé lipide A. Il induit la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6) ainsi que la production de prostaglandines et de radicaux libres par les macrophages.

Une production excessive et non contrôlée de ces facteurs peut conduire à des effets délétères comme des dommages tissulaires et des baisses de pression sanguine pouvant induire un choc septique. L'identification des récepteurs du LPS et des voies de signalisation associées a permis de comprendre le mode d'expression de ces facteurs. Depuis quelques années, de plus en plus de données démontrent l'existence de nombreux mécanismes visant à réguler l'activité du LPS.

Les facteurs inflammatoires sont surexprimés dans certaines pathologies même en l'absence de stimuli bactériens. Ainsi, de forts taux de TNF- $\alpha$  sont détectés chez les patients atteints de pathologies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn. L'étude des effets du LPS est un bon modèle pour comprendre les mécanismes de régulation de cette surexpression, ce qui pourrait aboutir au développement de nouvelles thérapies.

Depuis quelques années, un nouveau type de médiateur de l'inflammation a été décrit (Bukrinsky, 2002). En effet, les cyclophilines A et B sont fortement sécrétées en réponse à divers stimuli inflammatoires (Gonzalès-Cuadrado *et al.*, 1996 ; Tegeder *et al.*, 1997 ; Jin *et al.*, 2000 ; Liao *et al.*, 2000 ; De Ceuninck *et al.*, 2003) et participent au recrutement cellulaire sur le site de l'inflammation (Xu *et al.*, 1992 ; Sherry *et al.*, 1992 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; 2002 ; Allain *et al.*, 2002). Par ailleurs, la CyPA a été récemment identifiée comme un inducteur de facteurs inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-8 ou encore les MMP (Kim *et al.*, 2005).

Les cyclophilines A et B sont fortement exprimées chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde et semblent participer à la pathogenèse, notamment en interagissant avec leur récepteur, le CD147, qui est lui-même impliqué dans la progression de la maladie (Billich *et al.*, 1995 ; Konttinen *et al.*, 2000 ; Tomita *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2005). De plus, la CyPB initialement piégée par les protéoglycanes de la matrice extracellulaire est libérée par l'action de MMP (De Ceuninck *et al.*, 2003). Dans ce contexte, les macrophages résidants sont les premières cellules susceptibles de répondre à la CyPB. Dès lors, nous nous sommes intéressés au rôle de la CyPB dans la synthèse de facteurs inflammatoires, soit directement soit en tant que régulateur des effets du LPS. Avant de présenter les résultats obtenus, il est nécessaire de présenter le mode d'action du LPS et les différents mécanismes

mis en place par le macrophage pour éviter l'emballement de la réaction inflammatoire, en s'intéressant plus particulièrement à la régulation de l'expression du TNF- $\alpha$ .

## I. Mécanismes d'activation et de régulation de l'expression du TNF- $\alpha$ .

### A. Le récepteur du LPS

Le LPS se fixe à la surface des macrophages sur un récepteur complexe composé de 3 protéines, le CD14, le TLR4 (*Toll-like receptor 4*) et la protéine adaptatrice, MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*) (figure 18).

#### A. 1. Le CD14

Le CD14 est une glycoprotéine de 55 kDa présente sous forme soluble ou membranaire à la surface des cellules myéloïdes par l'intermédiaire d'une ancre GPI. La présence de CD14 permet de réduire de 100 à 1000 fois la concentration de LPS nécessaire à l'activation des macrophages. A l'inverse, les souris déficientes en l'expression de CD14 sont résistantes au choc septique induit par le LPS. Les cellules endothéliales et épithéliales n'expriment pas de CD14 membranaire, mais répondent au LPS en utilisant la forme soluble. Ces données démontrent l'importance du CD14 dans les réponses du LPS.

Outre le LPS, le CD14 sert de récepteur pour la reconnaissance d'autres produits bactériens comme le peptidoglycane, l'acide lipoteichoïque et les lipoarabinomannanes.

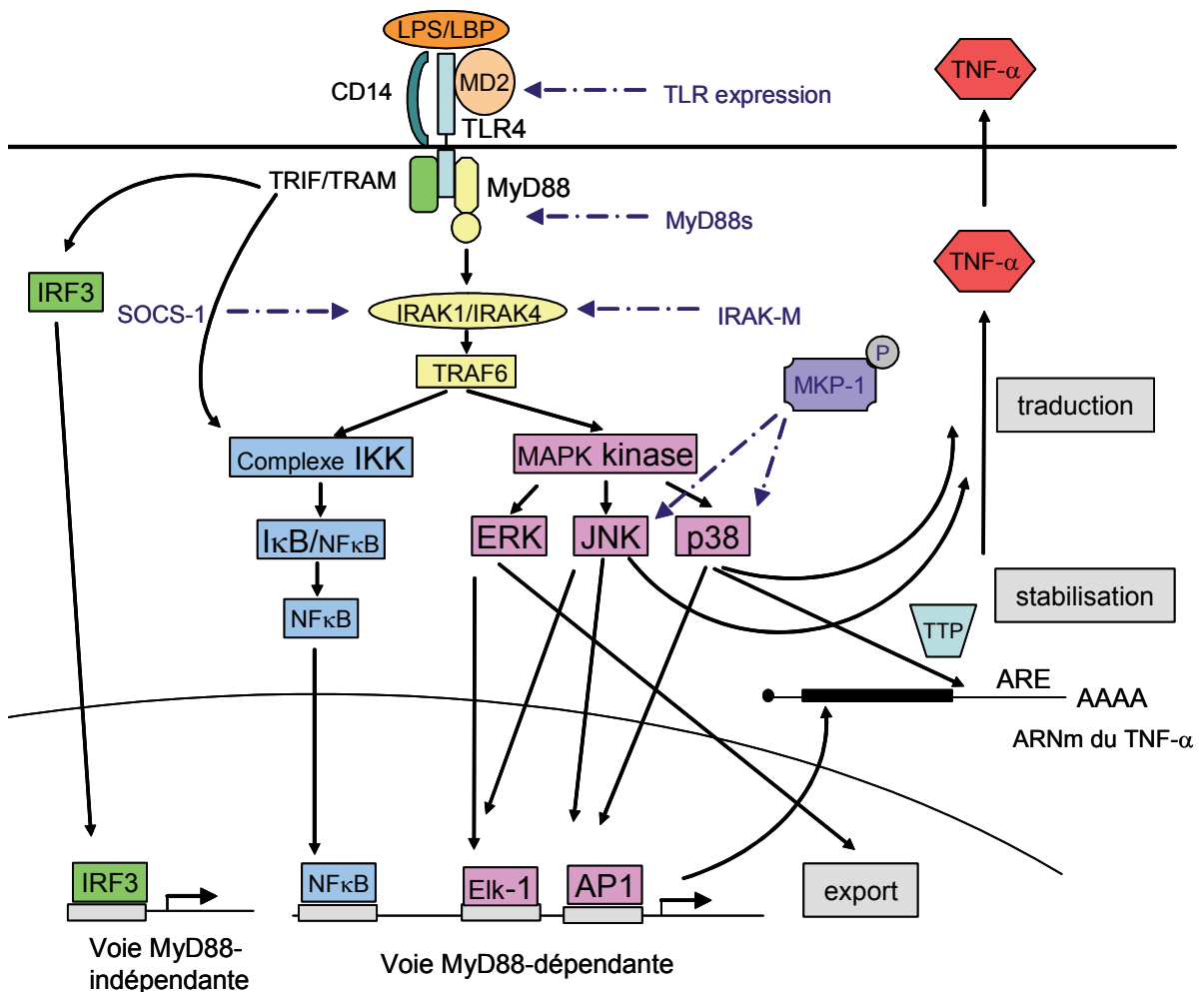
L'absence de domaines transmembranaire et cytoplasmique suggère que le CD14 doit être associé à d'autres molécules membranaires pour que la signalisation puisse avoir lieu (Fujihara *et al.*, 2003 ; Pålsson-McDermott & O'Neill, 2004).

Il a été démontré que les interactions entre le CD14 et le LPS sont favorisées par la fixation du LPS sur une protéine sérique, la LBP (*LPS-binding protein*) (Schumann *et al.*, 1990).

#### A. 2. Le couple TLR4/MD-2

Chaque espèce de bactérie produit différents composés reconnus par les cellules de l'immunité innée. Ces composés appelés PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) sont reconnus par une classe de récepteurs, les TLR. Découvert chez la Drosophile, 10 isoformes sont maintenant connues chez l'Homme. Les TLR sont caractérisés par un domaine

extracellulaire constitué de répétitions riches en leucine (LRR ; *leucine rich repeat*), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Ce dernier domaine est appelé TIR (*Toll/IL-1R/R*) car il est retrouvé dans le récepteur de l'IL-1 $\beta$  et dans les produits des gènes de résistance à l'infection chez les plantes (gènes R). Première isoforme à avoir été caractérisée chez les mammifères, le TLR4 est exprimé à la surface de la majorité des cellules immunitaires et principalement sur les macrophages et les cellules dendritiques. Des expériences d'inactivation ou de mutation du gène *tlr4* ont démontré son rôle comme récepteur du LPS. Bien qu'essentiel, le TLR4 n'est pas suffisant puisque sa surexpression dans les cellules HEK293 insensibles au LPS n'a aucun effet (Fujihara *et al.*, 2003 ; Liew *et al.*, 2005).



**Figure 18** : Mécanismes d'activation et de régulation des voies de signalisation induites par le LPS dans les macrophages. (Schéma modifié d'après Fujihara *et al.* (2003) et Liu *et al.* (2007) —> activation -.-> régulation négative

En effet, le TLR4 doit être associé par son domaine extracellulaire à une petite glycoprotéine dépourvue de domaine transmembranaire, la MD-2. Les souris invalidées pour MD-2 présentent les mêmes phénotypes que celles déficientes en TLR4, démontrant que MD-2 est indispensable aux réponses cellulaires dépendantes du TLR4 (Nagai *et al.*, 2002). MD-2 participe également à la spécificité de reconnaissance des ligands et à la distribution membranaire du TLR4 (Fujihara *et al.*, 2003).

## **B. Voies de signalisation activées par le récepteur du LPS**

Le LPS active deux voies majeures de signalisation: la voie NF- $\kappa$ B et les voies MAPK. Ces activations sont essentielles à l'expression de facteurs inflammatoires. Ainsi, de nombreux travaux ont permis d'élucider le mode d'activation et de régulation de ces voies.

### **B. 1. Activation des voies de signalisation**

#### **B. 1.1. Voie dépendante de MyD88**

L'homologie du domaine intracellulaire des TLR avec la famille du récepteur de l'IL-1 $\beta$  a suggéré l'existence de partenaires communs. Ainsi, comme pour l'IL-1R, il a été démontré que les protéines adaptatrices MyD88 (*myeloid differentiation factor-88*) et TRAF6 (*TNF-receptor activated factor 6*), et les kinases IRAK (*IL-1 receptor associated kinases*) sont activées par le LPS.

MyD88 est constituée d'une partie C-terminale contenant un domaine TIR, séparé par une courte séquence du domaine N-terminal correspondant à un domaine DD (*death domain*). Ce domaine DD de MyD88 est homologue à ceux retrouvés chez le récepteur de mort cellulaire Fas ou celui du TNF- $\alpha$  et permet l'activation des voies de signalisation. MyD88 intervient également dans la signalisation induite par les TLR2, 3 et 9.

La fixation du LPS sur les cellules induit l'homodimérisation du TLR4 et le recrutement de MyD88. En effet, le domaine TIR de MyD88 s'associe à celui du TLR4 alors que le domaine DD va permettre le recrutement des kinases IRAK. Cette famille de kinases est composée de plusieurs membres dont certains sont des éléments activateurs (IRAK-1, -2 et -4) et d'autres régulateurs (IRAK-M, IRAK-2c, IRAK-2d). Selon le modèle proposé par Burns *et al.* (2003), les kinases IRAK-1 et -4 seraient recrutées par des dimères de MyD88, permettant la phosphorylation de IRAK-1 par IRAK-4. Dès lors, IRAK-1 va pouvoir activer TRAF6, qui à son tour est à l'origine de l'activation des kinases MAPK et IKK par l'intermédiaire de l'activation de TAK (*TGF- $\beta$ -activated kinase*).

Le complexe IKK est composé de deux sous-unités catalytiques (IKK $\alpha$ ,  $\beta$ ) couplées à une sous-unité régulatrice (IKK $\gamma$ ). L'activation de IKK conduit à la phosphorylation des I $\kappa$ B, les inhibiteurs du NF- $\kappa$ B. Cette phosphorylation aboutit à l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome des inhibiteurs I $\kappa$ B. Dès lors, la dissociation du complexe NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B permet la translocation au noyau du facteur de transcription jusqu'alors piégé dans le cytosol par ses inhibiteurs (Fujihara *et al.*, 2003 ; Pålsson-McDermott & O'Neill, 2004 ; Liew *et al.*, 2005) (figure 18).

De façon surprenante, il est apparu que les macrophages issus de souris déficientes en MyD88 conservaient leur capacité à activer la translocation du NF- $\kappa$ B et l'activation des MAPK. Toutefois, la cinétique d'activation est retardée, démontrant que l'interaction entre le LPS et le TLR4 conduit à l'activation de deux voies différentes dont une est dépendante de MyD88 (Kawai *et al.*, 1999).

### B. 1.2. Voie indépendante de MyD88

La voie indépendante de MyD88 passe par le recrutement et l'activation de l'hétérodimère TRIF/TRAM (*TIR domain-containing adaptor inducing IRF-3/TRIF-related adaptor molecule*) par le domaine TIR des TLR. Elle permet l'activation retardée de NF- $\kappa$ B, des MAPK et du facteur IRF-3 (*Interferon regulatory factor*) et joue un rôle essentiel dans l'expression de certaines protéines telles que IP-10, MCP-5, NOS ou IFN- $\beta$  (Yamamoto *et al.*, 2003). L'expression d'IFN- $\beta$  est corrélée à l'activation du facteur de transcription STAT-1 et des protéines IRF-3 par le LPS (Fujihara *et al.*, 2003 ; Pålsson-McDermott & O'Neill, 2004).

Pour avoir une réponse optimale des cellules, le LPS active la signalisation cellulaire en deux temps par l'intermédiaire de deux mécanismes. Ce n'est que par l'inactivation à la fois de MyD88 et de TRIF que l'on peut obtenir une totale inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPK (Fujihara *et al.*, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2003).

## **B. 2. Description des voies NF- $\kappa$ B et MAPK**

### B. 2.1. Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B

Chez les mammifères, la famille NF- $\kappa$ B est constituée de cinq membres dont la structure est très conservée. Il s'agit des protéines Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50 et son précurseur p105) et NF- $\kappa$ B2 (p52 et son précurseur p100) qui sont retrouvées sous formes d'homo et d'hétérodimères. Bien que la majorité de dimères forment des complexes

activateurs de la transcription, les homodimères p50-p50 et p52-p52 peuvent se fixer sur les éléments *cis* des gènes et empêcher leur transcription (Ghosh & Karin, 2002).

La régulation de l'activité des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B se fait à différents niveaux. Comme nous l'avons déjà vu, ils sont piégés dans le cytosol grâce à leur liaison avec I $\kappa$ B. Certains travaux suggèrent la nécessité de la phosphorylation de p65 pour avoir une activité transcriptionnelle efficace, ce qui implique la régulation du facteur de transcription par d'autres kinases telles que les PKA, la caséine kinase II, la PKC $\zeta$ , le complexe IKK lui-même ainsi que NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase). L'inhibition de ces kinases a révélé des effets dramatiques sur l'activité de NF- $\kappa$ B. Néanmoins, la participation de ces kinases reste floue et serait dépendante du type cellulaire et des différents stimuli utilisés pour induire l'activation de NF- $\kappa$ B (Fujihara *et al.*, 2003).

### B. 2.2. Les voies MAPK

Les MAPK forment une famille de Ser/Thr kinases hautement conservées phylogénétiquement. Au nombre de 3 (p44/p42 MAPK, p38 MAPK, JNK), elles sont activées par des stimuli variés et présentent chacune des spécificités de substrat. Leur signal d'activation est la phosphorylation du motif T-X-Y qui engendre une modification conformationnelle et une augmentation de leur activité catalytique. Cette phosphorylation est dépendante de l'aboutissement d'une cascade de kinases (MAPK kinases kinases puis MAPK kinases). Elles agissent sur un grand nombre de substrats incluant des protéines kinases et des facteurs de transcription et ont la particularité de réguler le transport, la stabilité ou encore la traduction de certains ARNm.

Elles sont impliquées dans une myriade de processus physiologiques comme la prolifération, l'apoptose, les réponses immunitaires ou au stress. Leur importance dans la signalisation cellulaire explique leur rôle dans diverses pathologies comme l'athérosclérose, le diabète ou encore le cancer.

Dans le cas du LPS, les p44/p42 MAPK (ERK1/2) sont activées par les MAPK kinases (MAPKK) MEK-1 et -2, ce qui conduit à l'activation du facteur de transcription Elk-1. Elles sont également impliquées dans le transport des ARNm du TNF- $\alpha$  du noyau vers le cytoplasme (Dumitru *et al.*, 2000 ; Guha & Mackman, 2001).

L'activation de JNK1/2 (54 et 46 kDa) par les kinases MAPKK MKK-4 et -7, conduit à la phosphorylation de c-Jun, ATF-2 et Elk-1 qui sont des facteurs de transcription régulant



l'expression de nombreux médiateurs pro-inflammatoires. De plus, JNK régule positivement la traduction des ARNm du TNF- $\alpha$  (Swanek *et al.*, 1997 ; Guha & Mackman, 2001).

La p38 MAPK activée par les MAPKK, MKK-3 et -6 induit l'activation de plusieurs facteurs de transcriptions dont certains sont communs avec les deux autres voies tels que Elk-1 et ATF-2. Elle a aussi la particularité de phosphoryler des protéines en aval, les MK2 et MSK1, qui régulent l'activité des facteurs de transcription, CREB et ATF-1. Cette voie p38 MAPK est cruciale car elle régule la stabilité et la traduction de certains ARNm, notamment celui du TNF- $\alpha$  (Guha & Mackman, 2001). Des études ont montré que l'inhibition spécifique de la voie p38 MAPK par un composé de pyridinyl imidazol (SB203580) bloque l'expression du TNF- $\alpha$  et d'IL-1 (Badger *et al.*, 1996).

## **C. Mécanismes de régulation de l'activité du LPS**

### **C. 1. Modes de régulation de la signalisation**

De nombreuses études ont recherché les mécanismes de régulation de l'activité du LPS. Il a été démontré que des macrophages subissant une primo-infection par de faibles doses de LPS deviennent résistants à une seconde infection à hautes doses. Cette constatation a mis en évidence l'existence d'une tolérance à l'endotoxine mise en place par le macrophage dans le but de limiter les effets délétères du LPS et de prévenir du choc septique.

L'activation des macrophages par le LPS est un phénomène complexe mettant en jeu de nombreuses molécules et différentes voies de signalisation, suggérant la possibilité au macrophage d'agir à différents niveaux pour réguler son activation.

La diminution de l'expression du récepteur est un mécanisme courant pour réguler l'activité des ligands. Alors que l'expression du CD14 reste inchangée, le taux d'ARNm du TLR4 diminue dans les cas de tolérance à l'endotoxine. Néanmoins, cet effet semble insuffisant pour expliquer à lui seul l'inhibition de la synthèse de facteurs inflammatoires. Par ailleurs, des formes solubles de TLR capables d'inhiber les réponses cellulaires ont été identifiées (Qureshi *et al.*, 1999 ; Fujihara *et al.*, 2003 ; Liew *et al.*, 2005).

Les effecteurs solubles intervenants dans la signalisation sont de bons candidats pour participer à la tolérance du macrophage. En ce qui concerne la voie NF- $\kappa$ B, le macrophage peut empêcher la translocation du facteur de transcription en augmentant l'expression des inhibiteurs I $\kappa$ B, ou favoriser la formation du complexe p50/p50 répresseur de la transcription. Ensuite, il peut agir sur la balance « taux d'expression de IRAK-1/IRAK-M ». Une

diminution de l'expression de IRAK-1 au profit de celle de IRAK-M a été constatée dans les cellules tolérantes. De même, l'expression d'une forme tronquée de MyD88 (MyD88s) incapable de recruter IRAK-4 a été mise en évidence. Étonnamment, les protéines SOCS-1 (*suppressor of cytokine signaling*) décrites pour inhiber la voie JAK/Stat activée par les cytokines, se sont révélées être de bons inhibiteurs de l'activation des macrophages par le LPS. En effet, les souris déficientes en SOCS-1 sont hyper-réactives au LPS et ne présentent aucun phénomène de tolérance. Il a été démontré que la surexpression de SOCS-1 inhibe la voie indépendante de MyD88 en bloquant Stat1 et la voie dépendante de MyD88 en agissant sur NF- $\kappa$ B. Par ailleurs, SOCS-1 peut également inhiber IRAK-1 par fixation (Fujihara *et al.*, 2003 ; Pålsson-McDermott & O'Neill, 2004 ; Liew *et al.*, 2005).

Enfin, le macrophage peut contrecarrer la synthèse de facteurs inflammatoires en exprimant des médiateurs solubles ayant des propriétés anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou le TGF- $\beta$  (Fujihara *et al.*, 2003).

Dans plusieurs pathologies notamment les maladies auto-immunes, une forte expression de facteurs inflammatoires a été constatée, et tout particulièrement celle du TNF- $\alpha$ . En effet, son expression peut être augmentée d'un facteur 10.000 alors que la transcription de son gène est triplée. Ces données démontrent que la biosynthèse du TNF- $\alpha$  est régulée par un mécanisme post-transcriptionnel plus que transcriptionnel. Ainsi, différents mécanismes à l'origine de la régulation de cette expression agissent en accord pour assurer un contrôle étroit de la production (Anderson, 2004).

## **C. 2. Mécanismes de régulation de l'expression du TNF- $\alpha$**

### **C. 2.1. Régulation transcriptionnelle**

En réponse au LPS, l'induction de la transcription du gène du TNF- $\alpha$  est rapide et transitoire, soulignant la régulation de son expression. Le promoteur du TNF- $\alpha$  est complexe et composé de plusieurs éléments cis-régulateurs sur lesquels peuvent se fixer d'une part les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et d'autre part, les facteurs de transcription activés par les MAPK tels que Egr-1, Elk-1, c-Jun, ATF-2. La transcription est maximale quand les deux types de facteurs de transcription sont impliqués (figure 18).

### **C. 2.2. Régulation post-transcriptionnelle**

Cette régulation s'effectue grâce à la fixation de protéines sur les éléments riches en adénylate/uridylylate (ARE) présents au niveau du 3'UTR de l'ARNm du TNF- $\alpha$ . Ces éléments sont essentiels à la régulation de l'expression du TNF- $\alpha$ . En effet, des souris présentant la

délétion de ces éléments développent spontanément des maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde ou de la maladie de Crohn car leurs macrophages produisent 3 fois plus de TNF- $\alpha$  que les cellules de souris sauvages (Kontoyiannis *et al.*, 1999).

Les MAPK agissent sur ces ARE à différents moments de la vie de l'ARNm. L'export de l'ARNm du noyau vers le cytosol est contrôlé par l'activation de p44/p42 MAPK. Les voies p38 et JNK quant à elles régulent la répression de la traduction de l'ARNm. Les ARE peuvent fixer des protéines qui régulent la stabilité de l'ARNm. Cette stabilisation est dépendante de l'inhibition de la déadénylation de l'ARNm par la p38 MAPK (figure 18).

Plusieurs familles de protéines sont décrites pour intervenir dans la stabilisation des ARNm. La tristétraproline (TTP) est le prototype d'une famille de protéines à doigt de zinc-Cys-Cys-Cys-His. Elle a la propriété de déstabiliser les ARNm présentant des ARE. En effet, les souris déficientes en TTP souffrent d'inflammation sévère caractérisée par des symptômes d'arthrite et de dermatites. Ces problèmes inflammatoires se déclenchent spontanément dû à une forte expression de TNF- $\alpha$  corrélée à l'augmentation de la demi-vie de son ARNm. De nombreux transcrits de protéines pro-inflammatoires contiennent des ARE régulées par TTP, incluant le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , -2 et -6, le GM-CSF (Deleault *et al.*, 2007 ; Eberhardt *et al.*, 2007).

L'expression de TTP est rapidement activée en réponse à de nombreux stimuli inflammatoires notamment le LPS. Ces données suggèrent que l'induction de TTP serve de rétrocontrôle négatif aux effets du LPS, en agissant sur la stabilité de l'ARNm du TNF- $\alpha$ . Par ailleurs, son ARNm contient lui-même des éléments ARE, suggérant que la TTP régule sa propre expression. Il est à noter que les effets des MAPK sur l'ARNm de TTP sont différents de ceux observés pour le TNF- $\alpha$ . La voie p38 MAPK/MK2 activée par le LPS induit la transcription de TTP alors que JNK participe à la traduction de l'ARNm comme dans le cas du TNF- $\alpha$ . De façon surprenante, ERK permet la stabilisation de l'ARNm de TTP (Dumitru *et al.*, 2000). Ainsi, deux ARNm dont l'expression est induite par le LPS et présentant des éléments ARE sont régulés différemment par les voies MAPK, soulignant la complexité des voies de signalisation et de la régulation de l'expression des gènes-ARE dépendants. Cette complexité est augmentée par le fait qu'en plus d'induire l'expression de TTP, la MK2 activée par p38, va inhiber TTP par phosphorylation. En effet, cette phosphorylation diminue la capacité de TTP à se lier aux ARE (Dean *et al.*, 2004). Au début de l'activation cellulaire par le LPS, la voie p38/MK2 est fortement activée, induisant l'inhibition de TTP et permettant la traduction de l'ARNm du TNF- $\alpha$ . Cette forte activation étant transitoire, dès le retour à une

activation faible de p38, la TTP est déphosphorylée et peut réguler le taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  présent en même temps que sa propre dégradation (Deleault *et al.*, 2007).

Comme la TTP, les protéines TIA-1 (*T-cell intracellular antigen-1*) et TIAR (*TIA-1 related*) inhibent l'expression de facteurs inflammatoires en se liant aux ARE. Ils auraient la particularité de fonctionner comme des « silencers » de la traduction (Anderson *et al.*, 2004 ; Dean *et al.*, 2004). En revanche, les protéines de la famille Hu comme HuR se lient avec une forte affinité aux ARE de façon à stabiliser les ARNm (Dean *et al.*, 2004 ; Eberhardt *et al.*, 2007).

### C. 2.3. Les MAPK phosphatases, des régulateurs de poids des MAPK

Depuis quelques années, une nouvelle classe de protéines a été décrite pour réguler négativement l'activité des MAPK. Ces protéines sont des phosphatases appelées MKP (*MAPK phosphatase*). Elles déphosphorylent spécifiquement les résidus de tyrosine et de thréonine des MAPK activées, c'est pourquoi elles sont aussi dénommées DUSP (*dual specificity phosphatase*). MKP-1 est l'archétype de cette famille qui compte à ce jour au moins 10 membres. Les différentes isoformes sont classées en fonction de leur spécificité de substrat, de leur localisation cellulaire et de leur mode de régulation (Keyse, 2000 ; Liu *et al.*, 2007 ; Wang & Liu, 2007).

MKP-1 est rapidement exprimée en réponse à divers stimuli comme les facteurs de croissance et les conditions inflammatoires et de stress. Il a été démontré que MKP-1 déphosphoryle p38 et JNK préférentiellement à Erk1/2 (Franklin & Kraft, 1997 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Chi *et al.*, 2006 ; Hammer *et al.*, 2006). En effet, l'expression de MKP-1 est concomitante avec l'inactivation des MAPK p38 et JNK, ce qui conduit à la régulation de l'expression du TNF- $\alpha$ . Elle inhiberait les effets stabilisateurs de p38 sur les ARNm du TNF- $\alpha$  et régulerait négativement la traduction des ARNm. En interagissant avec les MAPK, elle pourrait également réguler leur localisation cellulaire. L'activation des Erk1/2 serait à l'origine de l'expression de MKP-1 par le LPS, démontrant que la régulation des MAPK se fait par un mécanisme de « cross-talk » entre les voies MAPK (Chen *et al.*, 2002 ; Xiao *et al.*, 2002 ; Shepherd *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Chi *et al.*, 2006). Ces résultats ont été confirmés par l'invalidation génique de MKP-1 chez la souris. Ces animaux développent spontanément des pathologies comme l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn (Chi *et al.*, 2006).

Bien qu'actives dès leur synthèse, les MKP sont hautement régulées au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et même post-traductionnel. L'ARNm de MKP-1

contient des éléments ARE régulés par TTP et HuR (Dean *et al.*, 2004 ; Wang & Liu, 2007) et la voie p44/p42 MAPK phosphoryle MKP-1 sur différents sites, ce qui induit le triplement de la demi-vie de la phosphatase (Brondello *et al.*, 1999).

MKP-1 est décrite comme un élément à l'origine du contrôle de l'expression de protéines inflammatoires induites par le LPS. Cette phosphatase se retrouve donc au centre du mécanisme régulateur des activités du macrophage, notamment en ce qui concerne la tolérance aux endotoxines (Nimah *et al.*, 2005 ; Hu *et al.*, 2007). L'activité de certains facteurs anti-inflammatoires s'explique par leur capacité à réguler positivement MKP-1. Ainsi, le mode d'action des glucocorticoïdes comme la dexaméthasone serait dépendant de MKP-1. Sa surexpression est également induite par le TGF- $\beta$ , suggérant que la phosphatase est un élément à l'origine de la diminution de TNF- $\alpha$  induite par la cytokine (Xiao *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Lui *et al.*, 2007 ; Wang & Lui, 2007).

Les mécanismes de régulation des activités inflammatoires des macrophages sont nombreux et bien décrits dans le cas du LPS et du TNF- $\alpha$ . La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour le traitement de nombreuses pathologies liées à la surexpression des facteurs inflammatoires comme le choc septique ou les maladies auto-immunes. L'arthrite rhumatoïde est un bon exemple car le TNF- $\alpha$  joue un rôle primordial dans la pathogenèse. En effet, il y est surexprimé et induit l'expression de MMP, de cytokines et autres médiateurs de l'inflammation (prostaglandine E2, radicaux libres et molécules d'adhérence) (Maruotti *et al.*, 2007).

Sécrétée constitutivement par les fibroblastes et les chondrocytes, la CyPB est piégée par les protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Dans un contexte inflammatoire, elle est massivement libérée par l'action de MMP, suggérant que les macrophages résidants sont les plus susceptibles de répondre à la CyPB (De Ceuninck *et al.*, 2003). La question de l'effet de la CyPB dans les contextes inflammatoires reste entière. Pour mener cette étude, nous avons utilisé la lignée cellulaire THP-1 différenciée en macrophages et comparé les activités de la CyPB avec celles du LPS.

## II. La CyPB, une protéine inflammatoire ?

### A. La CyPB, un inducteur de facteurs inflammatoires ?

Des données bibliographiques publiées récemment attribuent de nouvelles activités inflammatoires à la CyPA. Elle a été décrite pour induire la synthèse de facteurs pro-

inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 et MCP-1 par les macrophages. Elle favoriserait également la sécrétion de MMP9 par les cellules pro-monocytaires humaines et les macrophages murins, ainsi que l'interconversion de la pro-MMP2 en sa forme active dans les cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2005). En parallèle, une étude a montré que la CyPA augmente la sécrétion d'IL-5 et d'IL-17 par les cellules cancéreuses pancréatiques (Li *et al.*, 2006).

Contrairement à nos travaux et à ceux de Yurchenko *et al.* (2002), Jin *et al.* (2004) ont montré que la CyPA active les voies JNK et p38 MAPK en plus de p44/p42 MAPK. La même année, une étude sur des myocytes de rat a confirmé ces résultats et montré l'activation de Akt (PKB) par la CyPA (Seko *et al.*, 2004). La voie NF- $\kappa$ B serait également activée en réponse à la CyPA dans les cellules endothéliales et les monocytes (Jin *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2005).

Les travaux antérieurs réalisés sur les cyclophilines de sécrétion ont montré que les deux isoformes partagent le même récepteur protéique (Denys *et al.*, 1998a ; Sherry *et al.*, 1998 ; Yurchenko *et al.*, 2001), et par conséquent certaines activités communes ont été décrites. Elles induisent le chimiotactisme de différentes populations leucocytaires comme les lymphocytes T, les neutrophiles et les monocytes (Xu *et al.*, 1992 ; Sherry *et al.*, 1992 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; Allain *et al.*, 2002 ; Arora *et al.*, 2005). Ces réponses cellulaires sont dépendantes de la génération d'un flux calcique et de l'activation de p44/p42 MAPK. Néanmoins, des différences ont été constatées. Les lymphocytes T répondent avec plus d'intensité à la CyPB qu'à son homologue, et cette dernière est incapable d'induire l'adhérence des lymphocytes T (Allain *et al.*, 2002). Les auteurs expliquent cette différence par la fixation de la CyPB sur les chaînes HS du syndécan-1, ce qui pourrait résulter en l'induction de signaux plus soutenus et/ou complémentaires.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur les propriétés des cyclophilines sécrétées décrites par Jin *et al.* (2004) et Kim *et al.* (2005). De façon surprenante, nos résultats avec la lignée cellulaire THP-1 différenciée en macrophages ne montrent aucune augmentation de la synthèse de TNF- $\alpha$  par la CyPB, autant au niveau de l'ARNm que de la protéine. De même, nous n'avons pas pu détecter d'augmentation significative de l'expression de MMP9 par la CyPB. Aucune MAPK à l'exception de p44/p42 MAPK n'est activée par la CyPB dans notre modèle cellulaire. L'ensemble de ces résultats est en contradiction avec les travaux de Jin *et al.*, (2004) et Kim *et al.* (2005), mais confirment ceux de Yurchenko *et al.* (2002).

Ces données contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que les cyclophilines utilisées sont des formes recombinantes produites à partir de vecteurs d'expression en système procaryote. Pour réaliser nos expériences, chaque préparation de CyPB est soigneusement détoxifiée, de façon à éviter toute réponse inflammatoire liée à la présence de contaminants d'origine bactérienne. En revanche, il n'est pas exclu que la présence d'une faible contamination, même dans les préparations commerciales de CyPA, soit à l'origine de l'expression de TNF- $\alpha$  par des cellules aussi sensibles que les monocytes/macrophages.

## **B. La CyPB, un modulateur de la réaction inflammatoire ?**

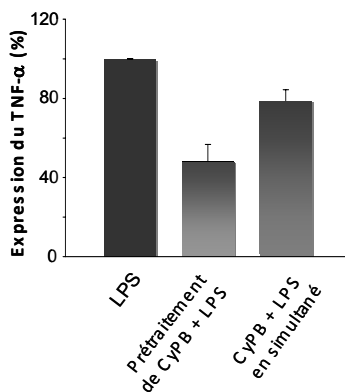
Les travaux antérieurs démontrent l'implication de la CyPB dans le recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation. Néanmoins, sa forte expression dans les contextes inflammatoires suggère sa participation dans d'autres activités. Nous avons donc analysé l'effet de la CyPB sur les macrophages activés, en utilisant le LPS comme activateur de la synthèse de facteurs inflammatoires.

### **B. 1. La CyPB inhibe l'expression du TNF- $\alpha$ induite par le LPS**

Pour cette étude, les cellules ont été placées pendant 16 h dans du RPMI sans sérum de veau en présence ou non de CyPB (50 nM), puis stimulées pendant 4 h avec du LPS (50 ng/mL). Les surnageants ont été récupérés et utilisés pour doser le taux de TNF- $\alpha$  produit. De façon surprenante, nous avons constaté qu'un pré-traitement des cellules par la CyPB réduit d'un facteur 2 la sécrétion de TNF- $\alpha$  induite par le LPS (figure 19). Cet effet est également visualisé mais à moindre échelle (20 % d'inhibition) si les cellules sont simultanément induites par le LPS et la CyPB (figure 19). Par ailleurs, cet effet est dépendant de la concentration en CyPB utilisée et du temps d'incubation de la protéine. Une inhibition est détectée dès 15 nM de CyPB lors d'une induction simultanée avec le LPS, et est optimale à 50 nM avec un pré-traitement de 16 h par la protéine.

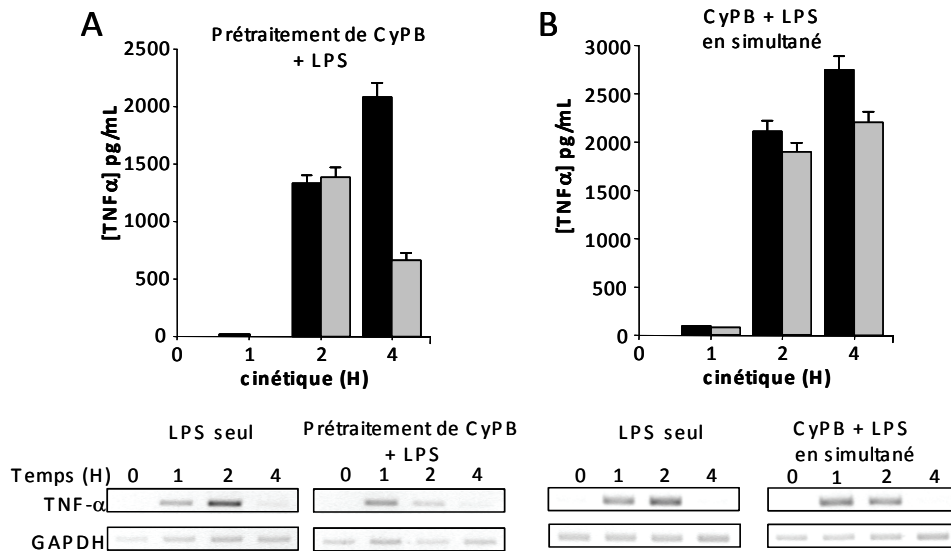
Ces résultats démontrent que la CyPB induit une désensibilisation des macrophages aux effets du LPS. Dans un premier temps, nous avons analysé par cytofluorimétrie en flux si la CyPB induit une diminution de l'expression des récepteurs du LPS. Aucune variation d'expression de CD14 et du TLR4 n'a été constatée entre les cellules incubées pendant 16 h avec de la CyPB et les cellules non traitées, démontrant que l'effet de la CyPB n'est pas dépendant de ce mécanisme.

Afin de comprendre l'effet de la CyPB, nous avons corrélé la cinétique de sécrétion du TNF- $\alpha$  avec la transcription de son ARNm par RT-PCR (figure 20). Indépendamment de la présence ou non de CyPB, l'expression de transcrits du TNF- $\alpha$  est similaire après une heure de stimulation par le LPS. En revanche, dès la deuxième heure, le taux d'ARNm chute considérablement si les cellules sont incubées pendant 16 h en présence de CyPB (figure 20A). Cette baisse significative d'ARNm est corrélée à la diminution de l'expression de la protéine. Dans le cas d'une stimulation simultanée par le LPS et la CyPB, le phénomène est moins marqué (figure 20B).



**Figure 19:** Effet inhibiteur de la CyPB sur la production de TNF- $\alpha$  produite par le LPS.

Les cellules THP-1 différenciées sont pré-incubées en présence de CyPB (50 nM) pendant 16h avant ou en simultanée de la stimulation par le LPS (50 ng/mL). Après 4h, les surnageants sont récupérés pour mesurer le TNF- $\alpha$  par ELISA. Ces résultats sont représentatifs d'au moins 6 expériences.



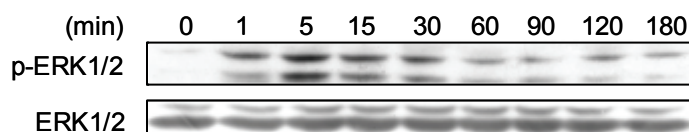
**Figure 20:** Effet de la CyPB sur la cinétique de production de TNF- $\alpha$  induit par le LPS. Les cellules sont stimulées par le LPS seul (barre noire) ou en présence de CyPB (barre grise) ajoutée soit 16 h avant stimulation (A), soit simultanément avec le LPS (B). Aux temps indiqués, le surnageant et les cellules sont collectés pour mesurer respectivement le TNF- $\alpha$  par ELISA et l'ARNm par RT-PCR. Ces résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences.



Ces résultats suggèrent que la CyPB ne bloque pas les signaux à l'origine de l'expression de la cytokine, mais agit sur un mécanisme de régulation post-transcriptionnel. Elle pourrait ainsi être impliquée dans la stabilité ou la traduction des ARNm.

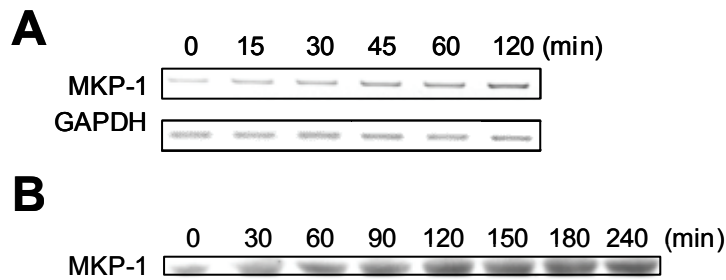
## **B. 2. Expression d'un régulateur de la transcription du TNF- $\alpha$ , la phosphatase MKP-1**

Parmi les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle mis en place pour contrôler la biosynthèse du TNF- $\alpha$ , l'activation des p44/p42 MAPK est impliquée dans le transport des ARNm du noyau vers le cytosol et dans l'expression de MKP-1. Cette phosphatase est connue pour accélérer l'inactivation de p38MAPK et de JNK, ce qui a pour effet de déstabiliser l'ARNm du TNF- $\alpha$  et empêcher sa traduction. Nous avons confirmé l'activation de la voie p44/p42 MAPK dans les cellules THP1 différenciées en macrophages. En réponse à une concentration optimale de CyPB (50 nM), la phosphorylation de Erk1/2 est observée dès 1 min et est maximale à 5 min (figure 21).



**Figure 21:** Effet de la CyPB sur l'activation de ERK1/2 dans les cellules THP1 différenciées. Les cellules sont incubées en présence de CyPB (50nM). Aux temps indiqués, les cellules sont lysées et les protéines totales sont séparées par électrophorèse puis transférées sur nitrocellulose pour une expérience de détection par immunorévélation. Les pistes supérieures montrent les formes phosphorylées de ERK1/2 alors que les pistes inférieures montrent les formes totales des deux kinases. Ces résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences

Dès lors, nous avons recherché si la CyPB pouvait induire l'expression de MKP-1. Par RT-PCR, nous avons montré que le transcrit de MKP-1 augmente dès 15 min d'incubation en présence de CyPB, et que le taux de transcrits reste élevé au-delà d'1 h d'incubation (figure 22A). En parallèle, l'expression de la protéine a été suivie par immunorévélation. Elle est détectée dès 30 min d'incubation, et son expression est maximale à 2 h et se prolonge au-delà de 4 h d'incubation (figure 22B).

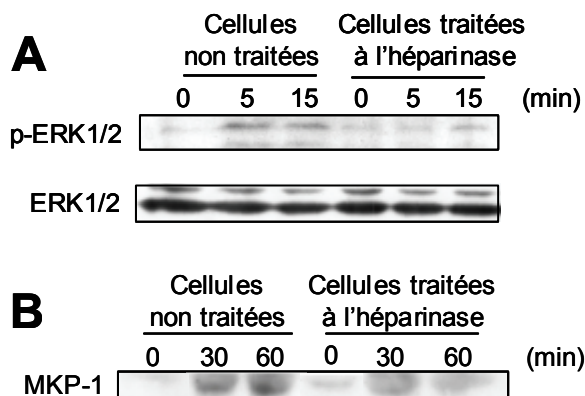


**Figure 22 :** Cinétique d'expression de MKP-1 induite par la CyPB.

Les cellules THP1/macrophages sont incubées en présence de CyPB. Aux temps indiqués, les cellules sont prélevées et utilisées pour la détection des transcrits de MKP-1 par RT-PCR (A) et de la protéine MKP-1 par immunorévélation (B). Ces résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences.

### B. 3. L'expression de MKP-1 induite par la CyPB est dépendante de l'activation de p44/p42 MAPK

Pour activer la voie p44/p42 MAPK, la CyPB doit interagir avec son récepteur composé du syndécan-1 et du CD147. Nos résultats antérieurs ont montré qu'un traitement des cellules à l'héparinase I ( $0,75U/10^6$  cellules) inhibe la phosphorylation des Erk1/2 induite par la CyPB (figure 23A). Nous avons alors comparé l'expression de MKP-1 dans des cellules traitées ou non à l'héparinase avant l'induction par la CyPB (figure 23B). L'expression de la phosphatase est fortement inhibée par ce traitement, confirmant l'importance de la voie p44/p42 MAPK dans les réponses induites par la CyPB et l'expression de MKP-1. Ces données indiquent que la CyPB a un effet sur la transcription et la stabilisation de MKP-1 par un mécanisme dépendant de p44/p42 MAPK.

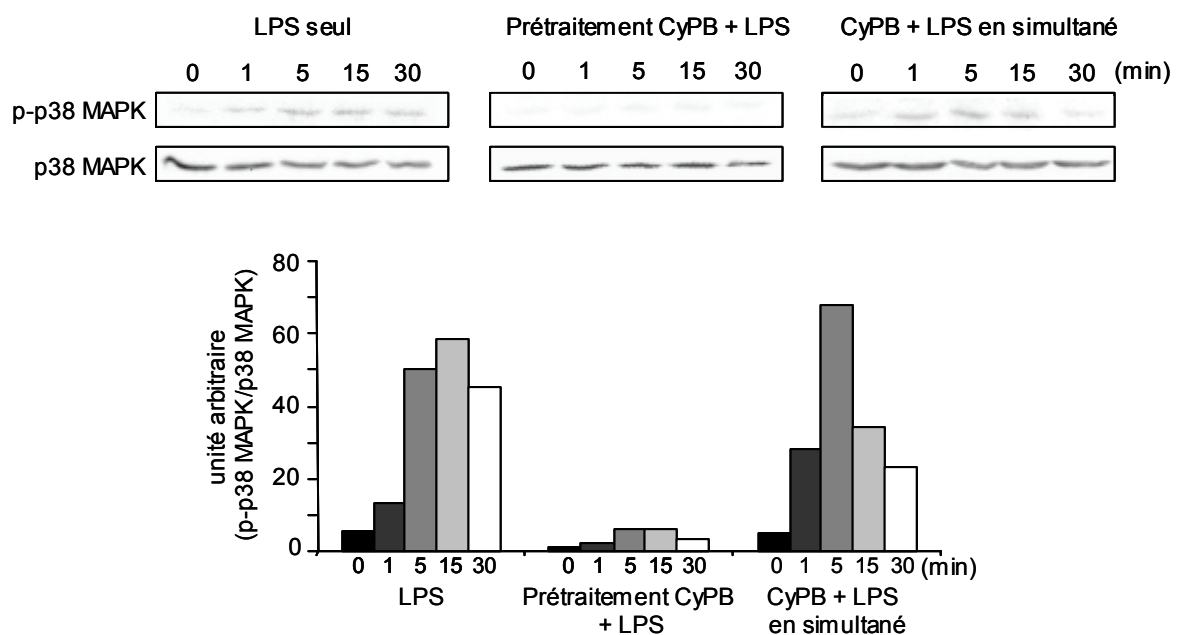


**Figure 23 :** Rôle de la voie p44/p42 MAPK sur l'expression de MKP1 par la CyPB.

Après un traitement de 2h à 37°C par l'héparinase I ( $0,75U/10^6$  cellules), les cellules sont incubées en présence de CyPB (50nM). Aux temps indiqués, ces cellules sont collectées et les lysats cellulaires sont préparés pour la détection des formes phosphorylées et totales de ERK1/2 (A) et de MKP-1 (B) (n = 3).

## B. 4. Effet de MKP-1 sur l'activation de la p38 MAPK activée par le LPS

Les données bibliographiques démontrent que MKP-1 présente une spécificité de substrat envers p38 MAPK et JNK. Ainsi, nous avons analysé l'effet de la CyPB sur la phosphorylation de p38 MAPK induite par le LPS. Pour étudier cette activité, les cellules ont été incubées ou non en présence de CyPB, puis stimulées par le LPS (figure 24). La phosphorylation de p38 MAPK est maximale après 15 min de stimulation et se prolonge à 30 min. Un pré-traitement de 16 h des cellules par la CyPB induit une inhibition de cette activation. Une diminution de la phosphorylation est également constatée si la CyPB est ajoutée en même temps que le LPS, mais seulement à partir du temps 15 min, suggérant qu'un délai est nécessaire à l'action de la CyPB. Ces résultats démontrent que la CyPB induit la déphosphorylation de p38, probablement grâce à l'accumulation de MKP-1.



**Figure 24:** Activité suppressive de la CyPB sur l'activation de la p38 MAPK.

Les cellules sont stimulées par le LPS en présence ou non de CyPB (50 nM) ajoutée soit 16 h avant stimulation, soit en simultanément avec le LPS. Aux temps indiqués, les cellules sont collectées et lysées. La phosphorylation de la p38 MAPK est analysée par immunorévélation. La révélation se fait par chimioluminescence, la quantification est réalisée grâce au logiciel de ChemiGenius (Ozyme). (n = 3).

Nous avons vu que MKP-1 est produite et stabilisée dès les premières minutes d'induction par la CyPB. Ces résultats pourraient expliquer le faible effet constaté sur la phosphorylation de p38 MAPK et sur la production de TNF- $\alpha$  lors d'un traitement simultané.

Ainsi, l'accumulation naissante de MKP-1 viendrait s'opposer progressivement aux effets du LPS. Campbell *et al.* (2004) ont montré que p38 MAPK régule positivement l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  en agissant sur l'activité transactivatrice de NF- $\kappa$ B. Ainsi, en inactivant p38 MAPK, MKP-1 agirait par des voies transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.

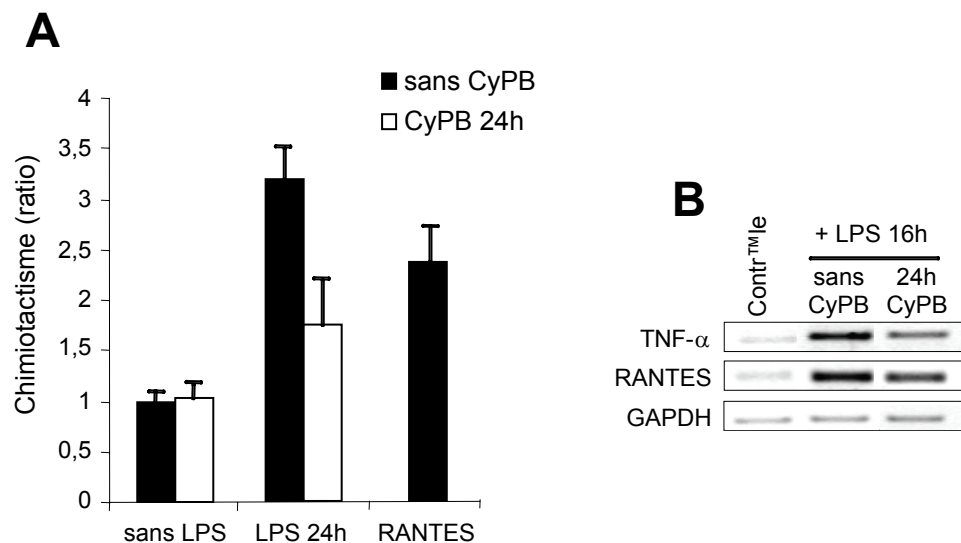
L'effet inhibiteur de la CyPB sur la transcription de l'ARNm ne semble pas visible après 1 h de stimulation par le LPS, suggérant que la CyPB agit plus sur la stabilité de l'ARNm du TNF- $\alpha$  plutôt que sur la transcription. Néanmoins, la méthode de RT-PCR semi-quantitative utilisée n'est pas suffisamment précise pour visualiser de faibles effets. L'analyse des échantillons par PCR en temps réel et l'utilisation de gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur du TNF- $\alpha$  avec ou sans la région 3'UTR permettraient d'affirmer cette hypothèse. En outre, comme cela a été décrit pour d'autres facteurs anti-inflammatoires, l'effet de la CyPB pourrait être dépendant d'un autre mécanisme qui viendrait compléter l'action de MKP-1.

## **B. 5. Effet de la CyPB sur les facteurs inflammatoires**

Afin d'étudier l'effet de la CyPB sur la production de facteurs chimioattractants, nous avons utilisé les surnageants des cellules THP1 comme milieux conditionnés pour réaliser une expérience de chimiotactisme. Les cellules THP1 ont été incubées ou non en présence de CyPB pendant 24 h avant d'être activées par le LPS pendant 24 h supplémentaires (figure 25A). De façon à ne pas contaminer les chimioattractants produits en réponse au LPS, les milieux de culture ont été changés entre la pré-incubation par la CyPB et la stimulation par le LPS.

Les surnageants des cellules stimulées par la CyPB présentent une activité chimioattractante réduite d'environ 50 % par rapport aux surnageants des cellules non stimulées. Ces résultats démontrent que le taux de chimioattractants sécrétés en réponse au LPS est diminué par un pré-traitement par la CyPB.

Les expériences ont été reconduites en incubant les cellules pendant 24 h en présence de CyPB, suivi d'une stimulation de 16 h par le LPS. Afin de corréliser la diminution du taux de chimioattractants à une inhibition de l'expression des ARNm, les cellules ont été récupérées pour la détection des transcrits du TNF- $\alpha$  et de RANTES. Alors que le LPS induit une forte expression des ARNm des deux cytokines, un pré-traitement des cellules avec de la CyPB provoque une diminution significative des deux transcrits (figure 25B).

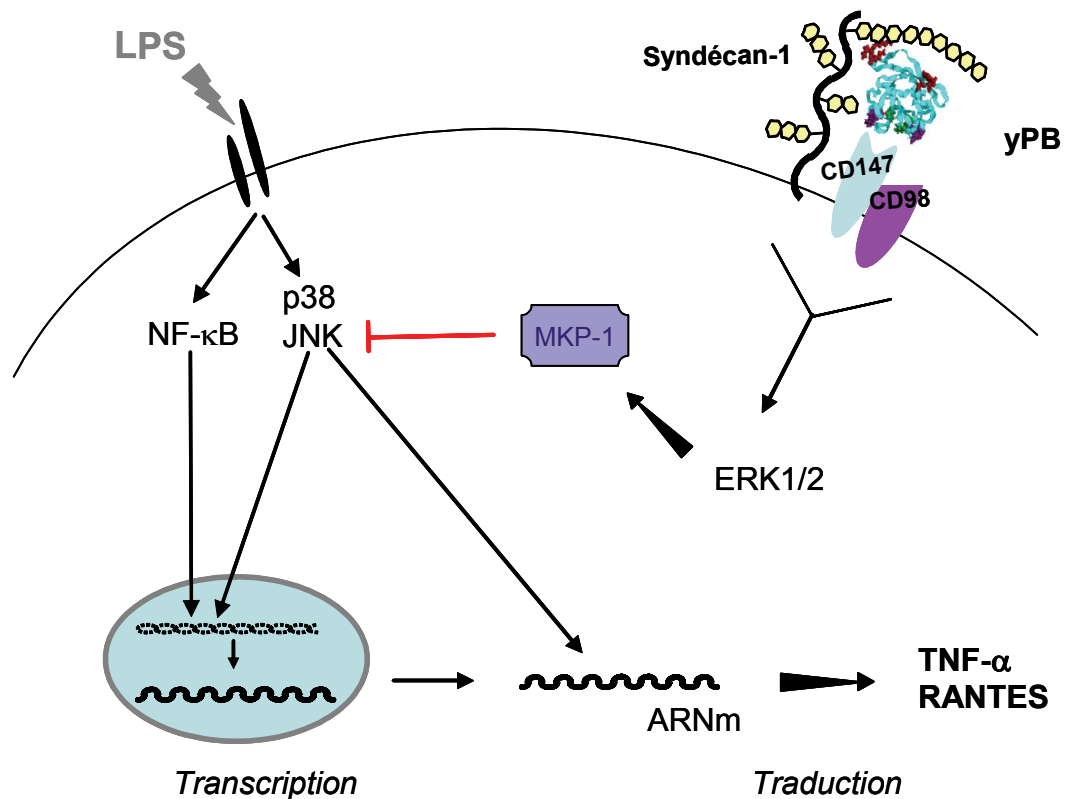


**Figure 25:** Effet de la CyPB sur la production de chimioattractants induite par le LPS

Les cellules THP1 différenciées sont traitées par la CyPB (50nM) pendant 24h. Après élimination du milieu, les cellules sont stimulées par le LPS (50 ng/mL) pendant 16 ou 24h. (A) Les surnageants de culture (milieux conditionnés) sont récupérés puis testés pour leur propriété chimioattractante sur les lymphocytes T du sang. RANTES (15 nM) est utilisé comme témoin positif (B) Les cellules sont utilisées pour la détection des ARNm du TNF- $\alpha$  et de RANTES par RT-PCR. (n = 3

A la différence du TNF- $\alpha$ , l'ARNm de RANTES ne présente pas de séquence ARE. Cette observation suggère que la CyPB n'agit pas sur la stabilité de l'ARNm de la chimiokine. Les travaux de Pradervand *et al.* (2006) ont montré que la transcription de RANTES est dépendante de l'activité de NF- $\kappa$ B et de JNK. Ainsi, l'action de MKP-1 sur JNK peut expliquer l'effet obtenu sur l'expression de RANTES, ce qui conforte notre hypothèse d'un effet transcriptionnel de la CyPB sur la régulation d'expression de facteurs inflammatoires.

En conclusion, nos travaux sont les premiers à attribuer un rôle modulateur de la réaction inflammatoire à la CyPB. En induisant l'expression et l'accumulation de MKP-1, la CyPB atténuerait la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires par les macrophages en réponse au LPS (figure 26).



**Figure 26:** Rôle de MKP-1 dans l'effet modulateur de la réaction inflammatoire induit par la CyPB

### III. Matériel & Méthodes

#### Anticorps et produits

La CyPB humaine recombinante est produite en routine au Laboratoire (Spik *et al.*, 1991). Après purification, la CyPB est détoxifiée par passage sur Détoxi-gel (Pierce Chemicals, Rockford, IL, USA). Le taux d'endotoxine résiduelle mesuré par le test de Limulus (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA) est inférieur à 0,09 E.U./μg de CyPB. L'anticorps monoclonal de souris anti-phospho-ERK1/2 (p44/42 MAPK) (E-4), l'anticorps monoclonal de lapin anti-p38 (C-20), l'anticorps monoclonal de lapin anti-MKP-1 (V-15) et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TLR4 (C-18) proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorps polyclonal de lapin anti-ERK1/2 et les anticorps de

souris et de chèvre conjugués à la fluorescéine proviennent de Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA). L'anticorps de souris anti-CD3 (X35) utilisé pour vérifier la pureté des lymphocytes provient de BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). L'anticorps monoclonal de souris anti-CD14 (My4) est commercialisé par Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). La phosphorylation spécifique de p38 MAPK et de MKP1 est suivie grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-phospho-p38 (28B10) (Cell Signaling, Beverly, MA, USA). Les anticorps secondaires anti-souris et lapin couplés à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) ont également été utilisés pour les immunorévélatations. Les amorces d'oligonucléotides utilisés ont été synthétisées et purifiées par Eurogentec (Seraing, Belgique). Les produits utilisés en culture cellulaire proviennent de Cambrex Bio Sciences (Belgique). Les produits dont l'origine n'est pas précisée sont commercialisés par Sigma.

### Culture cellulaire

Les cellules leucémiques promonocytaires humaines THP1 (88081201, ECACC, PortonDown, Salisbury, UK) sont cultivées en routine dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par de la L-glutamine (2 mM), de la gentamycine (10 mM), du  $\beta$ -mercaptoéthanol (20  $\mu$ M) et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) dans une atmosphère saturée en humidité à 37°C enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Ces monocytes sont différenciés en cellules de type macrophages en présence de 1- $\alpha$ -25-dihydroxy-vitamine D3 (50 nM) (Calbiochem, Germany) dans un milieu complet sans  $\beta$ -mercaptoéthanol pendant 3 jours. L'analyse de l'expression du CD14 par cytofluorimétrie en flux permet de vérifier l'efficacité de la différenciation.

Les cellules sont activées par la CypB (50 nM) ou par le LPS 055B5 (50 ng/mL) (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA). L'effet anti-inflammatoire est mesuré par ajout de CypB (50 nM) 16 h avant ou simultanément à l'induction par le LPS.

Pour les expériences de chimiotactisme, les cellules mononucléées sont isolées du sang humain (Etablissement Français du Sang, Lille) par centrifugation sur un milieu de séparation de densité 1,077g/mL (LymphoPrep, AbCys, France). Après lavage, les cellules sont remises en suspension dans du RPMI/SVF 10 % (v/v) à une densité cellulaire de 5.10<sup>6</sup> cellules/ml et incubées 1 h à 37°C de façon à éliminer les monocytes par adhérence sur plastique. La pureté de la population lymphocytaire recueillie est vérifiée par cytofluorimétrie en flux grâce à un anticorps anti-CD3 (> 95% de lymphocytes).

### Immunorévélation sur nitrocellulose

1 million de cellules sont activées par la CyPB et/ou par le LPS durant les temps indiqués, puis lysées dans 70  $\mu$ L de tampon phosphate (20 mM) pH 7,4 contenant 350 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 1 % Triton X-100 (v/v), 20 % de glycérol (v/v), 1 mM d'orthovanadate, 10 mM de NaF et un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche, Meylan, France) pendant 3h à 4°C. Les lysats sont déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 10%. Après électrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), les membranes sont bloquées pendant 1h à température ambiante dans un tampon Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 (v/v), pH 7,6 (TBS-Tween) complété par 3% de BSA. La détection des protéines d'intérêts est réalisée grâce à des anticorps primaires spécifiques incubés dans un tampon TBS-Tween-BSA 1 % pendant 2h à température ambiante, suivie d'une seconde incubation d'une 1h en présence d'anticorps anti-IgG couplés à la peroxydase. La révélation des protéines est réalisée par chemiluminescence (ECL PLUS Western Blotting System, Amersham Biosciences).

### Détection des ARNm par RT-PCR

Les ARN totaux sont isolés à partir de  $3 \times 10^6$  cellules à l'aide du kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Allemagne). L'équivalent de 2  $\mu$ g d'ARN est utilisé pour la synthèse des ADNc grâce à un primer oligo-dT et à la transcriptase reverse M-MLVRT (Promega, Madison, WI, USA).

L'amplification génique est réalisée à partir de 2  $\mu$ L de produit de rétrotranscription avec la polymérase GoTaq en présence de déoxy-NTP et de 150  $\mu$ M de primers spécifiques du gène d'intérêt. La GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase-3A) est amplifiée en parallèle de façon à contrôler le taux d'ARN utilisé dans les réactions de PCR. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium et visualisés sur un transilluminateur (Gel Doc 2000 Image analysis, Bio-Rad, France). L'analyse semi-quantitative est réalisée grâce au logiciel Quantity One (Bio-Rad, France). La séquence du produit d'amplification a été vérifiée par séquençage (Genoscreen, Lille, France). Les séquences des amorces sont détaillées dans le tableau suivant :



ADNc cible	Séquences des amorces sens (S) et anti-sens (AS)	Taille du produit de PCR	Température d'hybridation	Nombre de cycles
GAPDH	S 5'-ggt-gga-cct-gac-ctg-ccg-tct-a-3' AS 5'-gag-gtc-cac-cac-cct-gtt-gct-g-3'	240 pb	69°C	18
TNF- $\alpha$	S 5'-ctt-ctc-ctt-cct-gat-cgt-gg-3' AS 5'-gct-ggt-tat-ctc-tca-gct-cca-3'	266 pb	60°C	22
RANTES	S 5'-ggc-agc-cct-cgc-tgt-cat-cct-ca-3' AS 5'-ctt-gat-gtg-ggc-acg-ggg-cag-tg-3'	130 pb	60°C	22
MKP-1	S 5'-gct-gtg-cag-caa-aca-gtc-ga-3' AS 5'-cga-tta-gtc-ctc-ata-agg-ta-3'	432pb	55°C	30

### Dosage du TNF- $\alpha$ par méthode ELISA

Les surnageants des cellules stimulées par la CyPB et/ou le LPS sont utilisés pour estimer la quantité de TNF- $\alpha$  produit. Le dosage est réalisé selon les instructions du fabricant (AbCys, France). Après adsorption d'anticorps anti-TNF- $\alpha$  (2,5 $\mu$ g/mL) sur une plaque Maxi-Sorb (Nalge Nunc, Danemark) pendant une nuit à 4°C, 100  $\mu$ L de TNF- $\alpha$  recombinant à des concentrations croissantes ou 100  $\mu$ L de surnageant dilué au 1/5 sont incubés en présence de 50  $\mu$ L de biotine couplée à un anticorps anti-TNF- $\alpha$  dilué au 1/1000 durant 2h à température ambiante. Après lavages, 100  $\mu$ L de streptavidine couplée à la peroxydase diluée au 1/5000 sont incubés pendant 1h. La révélation se fait par ajout de 100  $\mu$ L d'une solution de 5 mg d'ortho-phénylènediamine (Sigma, France) dans 10 mL de tampon PBS-citrate pH 5,5 et 10  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à l'obscurité. La réaction est arrêtée par ajout de 50  $\mu$ L d'acide sulfurique 4N. L'intensité de coloration est mesurée par densité optique à 450 nm.

### Analyse du chimiotactisme

Les expériences de chimiotactisme sont réalisées en utilisant des chambres de micro-diffusion (Corning Costar Corp, Cambridge, MA, USA) contenant deux compartiments séparés par une membrane de polycarbonate dont les pores sont de 5  $\mu$ m. La membrane est préalablement traitée par flottaison sur une solution de fibronectine (10  $\mu$ g/mL) pendant 3 h à 37°C, de façon à ce que les lymphocytes ayant migré ne tombent pas au fond du puits. Un million de lymphocytes T (100  $\mu$ L) sont placés dans le compartiment supérieur alors que 600  $\mu$ L de milieu conditionné, correspondant au surnageant des cellules THP1 pré-incubées ou non avec de la CyPB pendant 24 h, puis stimulées par le LPS pendant 24h, sont placés dans le compartiment inférieur. Après 1 h d'incubation à 37°C, les cellules non adhérentes sont éliminées par lavages, alors que les cellules ayant migré sont fixées au paraformaldéhyde 3%

pH 7,8 à 4°C. Les cellules sont ensuite colorées au bleu de méthylène (1% dans le tampon borate 0,1 M, pH 8,2). L'intensité de la coloration bleue libérée par la lyse des cellules est mesurée à 595 nm et reliée au nombre de cellules en se référant à des courbes étalons exprimant les nombres de cellules en fonction de l'absorbance (Allain *et al.*, 2002).

#### Analyse statistique

Pour chaque expérience, les résultats ont été obtenus à partir d'au moins trois expériences différentes effectuées en triple exemplaire. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le *t*-test Student, et les valeurs de  $p < 0,05$  ont été considérées significatives.

# Conclusion

---

Initialement décrite en 1984 par Hanschumacher *et al.* comme récepteurs de la CsA, les cyclophilines ont été impliquées au fil des années dans des activités aussi diverses que variées. En effet, les données bibliographiques témoignent de leur participation dans le transport de protéines néosynthétisées, dans la régulation de l'apoptose et de l'activation de protéines de signalisation ou encore dans l'infection par certains virus tels que HIV ou HCV. La caractérisation de CyPA et CyPB dans les liquides biologiques (lait, plasma, liquides synoviaux) ou dans la matrice extracellulaire a encouragé les recherches sur les activités de ces formes sécrétées (Spik *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995 ; Billich *et al.*, 1995 ; Jin *et al.*, 2000 ; Liao *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2005). En effet, grâce à son peptide signal, la CyPB est sécrétée constitutivement par les fibroblastes et les chondrocytes, mais son expression et sa libération sont fortement augmentées en réponse à des stimuli inflammatoires par de nombreux types cellulaires. La CyPA est retrouvée à de fortes concentrations dans les sérums de patients souffrant de septicémie ou d'une infection par HIV et dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Toutefois, son mode de sécrétion reste à élucider. Différentes études réalisées *in vitro* ont montré que certains types cellulaires (macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales) sont capables de sécréter ces protéines en réponse à des stimuli inflammatoires ou des conditions de stress (Billich *et al.*, 1995 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; Tegeder *et al.*, 1997 ; Jin *et al.*, 2000 ; 2004 ; Liao *et al.*, 2000 ; De Ceuninck *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2005).

Les cyclophilines sécrétées induisent le chimiotactisme *in vitro* de nombreux types cellulaires telles que les lymphocytes T, les monocytes, les granulocytes, les éosinophiles (Xu *et al.*, 1992 ; Sherry *et al.*, 1992 ; Yurchenko *et al.*, 2001 ; Allain *et al.*, 2002). La CyPB a également la particularité d'augmenter l'adhérence des cellules T sur la fibronectine par un mécanisme dépendant de l'activation des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$  (Allain *et al.*, 2002). Ces activités inflammatoires ont permis de définir les cyclophilines sécrétées comme de nouveaux médiateurs de la communication intercellulaire (Bukrinsky, 2002).

Les travaux réalisés sur la CyPA et la CyPB ont montré que les deux isoformes partagent un même complexe récepteur de haute masse moléculaire constitué de plusieurs sous-unités, dont seulement une fut identifiée au CD147 (Sherry *et al.*, 1998 ; Allain *et al.*, 1999 ; Carpentier *et al.*, 1999a ; Pushkarsky *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2001). En effet, les cellules CHO ne répondent aux cyclophilines que si elles sont au préalable transfectées avec le CD147, démontrant que ce dernier est un élément fonctionnel du récepteur des cyclophilines. Le CD147 est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires aussi bien hématopoïétiques que non-hématopoïétiques. Or, la plupart de ces cellules ne répondent pas

aux cyclophilines sécrétées, ce qui confirme que le CD147 appartient à un complexe récepteur dont chaque élément a une fonction définie.

Par ailleurs, les travaux réalisés au Laboratoire ont démontré que la CyPB avait la particularité de se fixer sur deux types de récepteur. En plus du site de fixation commun avec la CyPA, la CyPB interagit avec une haute affinité avec les chaînes HS portées par des protéoglycanes membranaires (Denys *et al.*, 1997 ; 1998a). Ainsi, les sites de fixation de la CyPA et de la CyPB ne sont pas tous communs, ce qui explique les différences d'activités mises en évidence pour les deux protéines. En effet, la CyPA induit un flux calcique réduit par rapport à la CyPB, et elle est incapable d'augmenter l'adhérence des lymphocytes T à la fibronectine. Les protéoglycanes pourraient servir à présenter la CyPB au récepteur de façon à stabiliser les interactions et permettre un signal soutenu, et/ou intervenir directement dans la génération de signaux intracellulaires complémentaires.

L'utilisation de CsA empêche la fixation des cyclophilines à leur récepteur, suggérant que la région centrale très conservée de ces protéines, qui porte le site de fixation à la CsA et l'activité PPIase, est impliquée dans les interactions. En revanche, le complexe CyPB/CsA peut toujours se fixer aux cellules en interagissant avec les chaînes HS, car cette interaction a lieu au niveau de la partie N-terminale de la CyPB dont est dépourvue la CyPA. Ces données ont été confirmées par des expériences d'interactions avec des mutants obtenus par mutagenèse dirigée, ce qui a prouvé que les sites de fixation de la CyPB à ses récepteurs sont répartis de part et d'autre de la molécule (Carpentier *et al.*, 2002).

La participation du CD147 aux activités des cyclophilines est désormais largement établie (Yurchenko *et al.*, 2001 ; 2002 ; Allain *et al.*, 2002 ; Arora *et al.*, 2005). L'utilisation d'anticorps anti-CD147 bloquants inhibe les réponses cellulaires et moléculaires des cyclophilines. Néanmoins, aucune interaction directe n'a pu être caractérisée. Alors que la CyPB induit l'internalisation rapide de son récepteur, aucune diminution de l'expression membranaire du CD147 n'a été observée suite à la fixation de la CyPB. Par ailleurs, l'utilisation de CyPB mutée dans son site enzymatique (CyPB-R<sup>62</sup>) inhibe l'adhérence des lymphocytes T à la fibronectine (Carpentier *et al.*, 2002). En parallèle, les travaux de Yurchenko *et al.* (2002) ont montré que la proline 180 présente dans le domaine extracellulaire du CD147 est essentielle au chimiotactisme induit par les cyclophilines. Ces données suggèrent que l'activité PPIase est impliquée dans les réponses cellulaires induites par les cyclophilines. L'isomérisation de la liaison contenant la proline 180 induirait un changement conformationnel du CD147 à l'origine de la génération du flux calcique et de

l'activation de la voie p44/p42 MAPK. Une telle activité des cyclophilines peut paraître étonnante, mais la découverte de l'activité PPIase a suggéré la participation de ces protéines dans le repliement des protéines néosynthétisées. Récemment, Brazin *et al.* (2002) et Colgan *et al.* (2004) ont montré que la CyPA régule l'activité de la kinase Itk en catalysant l'interconversion *cis/trans* d'une liaison peptidyl prolyle de la protéine. La conformation de la liaison imide détermine la fixation des substrats et l'état d'activation de la protéine. Ainsi, en conformation *trans*, la kinase se lie à des protéines phosphorylables, alors qu'en conformation *cis*, elle se lie au domaine SH3 d'une autre molécule d'Itk. Ces données suggèrent qu'en favorisant la dimérisation de Itk, la CyPA agit comme un régulateur négatif de cette kinase. En outre, la CyP60 escorte le transport du CD147 de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique en interagissant par l'intermédiaire de son activité PPIase avec la proline 211 du récepteur (Pushkarsky *et al.*, 2005 ; Yurchenko *et al.*, 2005).

Les travaux réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. G. Lippens ont montré que la CyPB isomérisé un peptide de 15 acides aminés correspondant à la séquence protéique du CD147 qui contient la proline 180. Dans le but d'approfondir cette activité, nous avons décidé de produire dans un système procaryote la boucle du domaine immunoglobuline qui contient cette proline. Par une étude en RMN, nous pourrions savoir si le CD147 est réellement un substrat de la CyPB et si certains acides aminés de la boucle interagissent avec des acides aminés de la CyPB, situés à proximité du site catalytique. De plus, en suivant l'isomérisation de la proline 180 à l'intérieur de la boucle, nous pourrions visualiser si la CyPB induit un changement de conformation du CD147, ce qui pourrait se répercuter le long de la chaîne polypeptidique. Ces données devraient confirmer le modèle original de transduction du signal induit par la fixation des cyclophilines sur le CD147.

L'étude réalisée en RMN a confirmé l'implication du tripeptide KKK dans les interactions avec les chaînes HS obtenues par mutagenèse dirigée (Carpentier *et al.*, 1999b ; Hanouille *et al.*, 2007). En revanche, nous avons pu démontrer que le tripeptide YFD n'était pas impliqué dans une interaction directe, mais sert probablement à maintenir l'extrémité N-terminale de la protéine dans une orientation favorable à la fixation aux chaînes. L'hypothèse selon laquelle les HS induiraient un changement conformationnel de la CyPB à l'origine de l'augmentation de l'activité PPIase a été invalidée par les expériences d'isomérisation du peptide du CD147. Néanmoins, les expériences d'interactions que nous allons réaliser avec la CyPB complexée ou non à des oligosaccharides et la boucle du CD147 nous permettront de vérifier si les HS augmentent l'affinité de la CyPB pour ce domaine du CD147.

Les différences constatées entre les réponses cellulaires induites par la CyPA et la CyPB démontrent la participation des HSPG comme récepteur de la CyPB. En effet, le traitement à l'héparinase I abolit l'activité pro-adhésive de la CyPB ainsi que l'activation de la voie p44/42 MAPK. L'addition de chaînes HS solubles ne restaure pas cette activité, démontrant que les chaînes doivent être portées par un HSPG. Ces données suggèrent que la participation des HSPG ne se limite pas à la seule présentation de la CyPB à son récepteur, mais que ce second site de fixation sert de co-récepteur. Par ailleurs, l'adhérence cellulaire et la phosphorylation de Erk1/2 est dépendante du CD147. Ces données suggèrent que le CD147 et les HSPG agissent conjointement dans la génération de signaux intracellulaires. L'identification de la nature du ou des protéoglycanes impliqué(s) est essentielle à la compréhension des réponses induites par la CyPB.

Les lymphocytes T et les cellules THP-1 utilisées dans notre étude expriment le CD147 et plusieurs membres de la famille des HSPG (syndécan-1, -2 et -4, bétaglycan et CD44v3) et répondent de manière similaire à la CyPB. De façon à comprendre le rôle du protéoglycane dans l'activité pro-adhésive de la CyPB, nous avons combiné différentes méthodologies sur ces types cellulaires. En appliquant aux protéoglycanes la technique de retard sur gel, nous avons mis en évidence une association entre le CD147 et le syndécan-1 qui augmente significativement et transitoirement en réponse à la CyPB. Ces résultats suggèrent que par sa fixation sur les chaînes HS, la CyPB induit une oligomérisation et/ou une stabilisation du complexe conduisant à l'activation des voies de signalisation. En effet, le traitement respectif des lymphocytes et des cellules THP-1 par des anticorps anti-syndécan-1 ou des siRNA dirigés contre le syndécan-1 entraîne une inhibition de la phosphorylation de ERK1/2, ce qui se traduit par une diminution du chimiotactisme et de l'adhérence des cellules. Ces travaux sont en accord avec ceux de Hamon *et al.* (2004) et Charnaux *et al.* (2005) qui démontrent que le syndécan-4 est associé au CXCR4 en l'absence de SDF-1 et que cette association est fonctionnelle pour induire la voie p44/p42 MAPK par le ligand. Le mécanisme précis qui permet au syndécan-1 d'agir en coopération avec le CD147 pour réguler les fonctions d'adhérence de la CyPB reste à élucider.

La fixation de la CyPB sur les chaînes HS du syndécan-1 entraîne l'activation de voies de signalisation nécessaires à l'activation des intégrines, prouvant que le protéoglycane est un co-récepteur fonctionnel de la CyPB. Ces travaux viennent compléter les données bibliographiques sur les protéoglycanes qui relatent d'une part la participation des cores protéiques des protéoglycanes dans les activités des médiateurs solubles; le syndécan-4 pour

le FGF et le SDF-1, le syndécan-1 pour le HGF ou encore le CD44v3 pour RANTES (Volk *et al.*, 1999 ; Derksen *et al.*, 2002 ; Roscic-Mrkic *et al.*, 2003, Hamon *et al.*, 2004), et d'autre part l'implication grandissante des syndécans dans les mécanismes d'adhérence. Ils soulignent également que même si l'implication des syndécan-1 et -2 dans ces mécanismes est moins décrite que pour le syndécan-4, ces protéoglycanes ont une place importante dans la signalisation cellulaire (Oh *et al.*, 1997 ; 1998 ; Kusano *et al.*, 2000 ; Munesue *et al.*, 2002 ; Beauvais & Rapraeger, 2004).

Le CD147 est impliqué dans de nombreuses fonctions telles que l'expression de MMP, la régulation de l'activation des lymphocytes T et l'adhérence cellulaire . Ces activités sont dépendantes de son oligomérisation ou de son association avec d'autres protéines (Yurchenko *et al.*, 2006). En effet, il forme un complexe avec les intégrines et le CD98 qui régule les mécanismes d'agrégation homotypique (Cho *et al.*, 2001 ; Xu & Hemler, 2005). Sur la base de ces relations fonctionnelles, nous avons étudié le rôle du CD147 et la contribution du CD98 dans les activités pro-adhésives de la CyPB vis-à-vis des cellules THP1 différenciées en macrophages.

La comparaison des effets cellulaires et moléculaires induits par la CyPB et par un anticorps anti-CD98 activateur (AHN-18) montre que les deux molécules induisent l'adhérence et l'agrégation homotypique des cellules THP1 par un mécanisme dépendant des intégrines  $\beta 1$  et de l'activation de ERK1/2, de PKC $\delta$  et de PI3-K. Ces résultats suggèrent que la liaison de l'anticorps mime les effets de la CyPB, suggérant que le CD98 pourrait être impliqué dans la fixation et/ou la transduction du signal induit par la CyPB. Malheureusement, les expériences d'endocytose et de compétition de fixation n'ont pas permis de démontrer que la CyPB interagit avec le CD98. Néanmoins, l'inactivation du CD98 par siRNA a montré que la réduction de l'expression du CD98 inhibe l'activation de la PKC $\delta$  et de Erk1/2, et par conséquent l'adhérence cellulaire. D'autre part, dans notre modèle d'étude, nous avons pu confirmer l'association entre le CD147, le CD98 et les intégrines  $\beta 1$ , complexe déjà caractérisé par Cho *et al.* (2001) et Xu & Hemler (2005). A la différence des résultats obtenus pour le syndécan-1, l'ajout de CyPB n'induit pas d'augmentation significative de l'hétérocomplexe. L'ensemble de ces données explique l'effet des anticorps anti-CD147 bloquant et suggère l'implication de l'hétérocomplexe dans la génération des signaux nécessaires à l'adhérence induite par la CyPB.

De façon à mieux comprendre la voie de signalisation à l'origine de l'activation des intégrines  $\beta 1$ , nous avons utilisé différents inhibiteurs spécifiques. Les expériences réalisées



avec de la rottlérine ou de la wortmannine ont permis de comprendre le mécanisme séquentiel à l'origine de l'activation de la voie p44/p42 MAPK. Ainsi, la PI3-K induit l'activation de la PKC $\delta$ , qui est responsable de l'activation des protéines ERK1/2.

Ces données ont permis d'approfondir notre connaissance sur le récepteur de la CyPB sans toutefois permettre la caractérisation des éléments de nature protéique qui fixent la CyPB, si bien qu'il est rationnel de se demander si la protéine n'interagit pas uniquement par son activité enzymatique avec le CD147. L'activation cellulaire reposerait alors sur la fixation de la CyPB sur les chaînes HS et sur l'isomérisation de la proline 180 du CD147.

La biosynthèse des chaînes HS est un processus complexe et finement régulé dans lequel un précurseur non sulfaté [GlcA ( $\beta$ 1,4) GlcNAc]<sub>n</sub> subit des modifications à l'origine de l'extrême hétérogénéité structurale des chaînes. Ces modifications sont régies par un ensemble d'enzymes qui possèdent des spécificités de substrats différents. L'expression de ces enzymes est dépendante du type cellulaire et du niveau d'activation, ce qui permet de réguler les interactions entre les chaînes HS et certains ligands, et par conséquent de moduler les réponses cellulaires en fonction du contexte physiologique. Certaines HBP se fixent sur les chaînes HS par l'intermédiaire de motifs spécifiques. Ainsi, l'antithrombine interagit avec un pentasaccharide dont le résidu de glucosamine central porte un groupement 3-O-sulfate (Petitou *et al.*, 2003).

Certains types cellulaires comme les monocytes, les lymphocytes B ou les cellules endothéliales ne fixent pas la CyPB, en dépit de la présence de CD147 et du syndécan-1 à leur surface. Ces données suggèrent l'existence d'un motif spécifique reconnu par la protéine dont la synthèse est sous la dépendance de l'action et de l'expression de certaines enzymes. Dès 2004, nous avons déterminé que la CyPB se fixait sur un octasaccharide (Vanpouille *et al.*, 2004). L'identification d'un motif HS nécessite ensuite de déterminer les modifications structurales qui régissent l'interaction avec le ligand. En combinant des expériences d'interactions réalisées à l'aide d'un biosenseur de type Iasys, une méthode de retard sur gel appliquée aux chaînes HS et la technique de siRNA, nous avons démontré que la CyPB nécessite la présence d'une glucosamine 3-O-sulfatée, N-non substituée en position 2 de l'extrémité non réductrice de l'octasaccharide (Vanpouille *et al.*, 2007). Cette séquence signature est très rare du fait de sa complexité, mais a déjà été décrite, notamment comme motif reconnu par la protéine gD de l'HSV-1, ce qui suggère que le virus utilise le motif naturel de la CyPB pour entrer dans les cellules.

La découverte du motif spécifique de l'antithrombine III a permis le développement de dérivés hépariniques qui bloquent l'activité anti-coagulante de la protéine (Petitou *et al.*, 2003). La détermination précise des motifs spécifiques permettrait le développement de mimétiques d'héparanes sulfates antagonistes. Les travaux de Sarrazin *et al.* (2005) ont démontré que l'utilisation de molécules de synthèse fixant spécifiquement l'IFN- $\gamma$  inhibe les réponses de la protéine, ce qui pourrait permettre le traitement des pathologies où l'IFN- $\gamma$  joue un rôle majeur. La synthèse de telles molécules dans le cas de la CyPB pourrait l'empêcher de se fixer au syndécan-1. Ces composés permettraient de cibler certaines maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde où sont détectés de fort taux de CyPB et de CD147 (Billich *et al.*, 1995 ; Kim *et al.*, 2005). En parallèle, ces composés pourraient être utilisés pour lutter contre l'entrée du virus HSV-1 dans les cellules hôtes.

L'ensemble des travaux portant sur l'étude de l'interaction entre la CyPB et son complexe récepteur permet de présenter un modèle selon lequel la CyPB se fixe sur un octasaccharide d'héparane sulfate caractérisé par la présence d'une GlcNH<sub>2</sub> 3-O-sulfatée. Dès lors, l'isomérisation d'une liaison prolyle du CD147 induirait des modifications conformationnelles dans sa chaîne polypeptidique, qui se répercuteraient au niveau de celle du CD98. Le rapprochement entre le core protéique du syndécan, le CD147, le CD98 permettrait l'activation de la voie p44/p42 MAPK, à l'origine de l'augmentation de l'avidité des intégrines  $\beta$ 1.

Les mécanismes d'adhérence sont reliés à des phénomènes de polarisation de la membrane et à des réarrangements du cytosquelette. Les syndécans et les complexes CD98/intégrines sont présents dans les rafts qui sont des zones à faible densité soumises aux réorganisations de la membrane tandis que l'activité respective des syndécans et du CD147 peut être dépendante de leur oligomérisation, notamment dans les phénomènes d'adhérence (Kolesnikova *et al.*, 2001 ; Sun & Hemler, 2001; Tkachenko & Simons, 2002 ; Toole, 2003). Ces données démontrent que le récepteur de la CyPB n'est pas une entité figée mais que l'activation des voies de signalisation pourrait être consécutive à des réarrangements spatio-temporels des éléments qui le constituent.

L'étude des réponses cellulaires induites par les cyclophilines sécrétées a démontré leur implication dans le recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation (Xu *et al.*, 1992 ; Sherry *et al.*, 1992 ; Alain *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2002). Plus récemment,

plusieurs équipes ont démontré que la CyPA induit la synthèse de facteurs inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 et des MMPs. Ces activités sont dépendantes de l'activation des voies de signalisation p44/p42 MAPK, p38 MAPK et JNK, ainsi que du NF- $\kappa$ B (Jin *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2006). Dans le modèle cellulaire THP1 différencié en macrophages, nous n'avons pas pu caractériser ces nouvelles activités pour la CyPB. En accord avec les travaux de Yurchenko *et al.* (2002), nous avons montré que la seule voie MAPK activée par la CyPB dans les lymphocytes T et les cellules THP1 est p44/p42 MAPK.

En revanche, notre étude sur les macrophages suggère que la CyPB est un facteur modulateur de la réaction inflammatoire. En effet, l'addition de CyPB aux cellules THP1 différenciées en macrophages diminue l'expression de TNF- $\alpha$  induite par le LPS. L'inhibition est optimale lors d'un pré-traitement de 16 h par 50 nM de CyPB, ce qui démontre que l'effet de la CyPB est dépendant de sa concentration et du temps d'incubation avant la stimulation par le LPS. Ces résultats suggèrent que la CyPB agit en induisant l'expression de facteurs capables de bloquer la signalisation induite par le LPS.

Comme toute protéine impliquée dans le contrôle de l'activation de voies de signalisation, MKP-1 est finement régulée au niveau transcriptionnel comme post-transcriptionnel. Elle est induite rapidement en réponse à divers stimulus (LPS, dexaméthasone, TGF- $\beta$ 1, ...) grâce à l'activation de la voie p44/p42 MAPK (Chen *et al.*, 2002 ; Xiao *et al.*, 2002 ; Shepherd *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2005). Son expression est stabilisée par phosphorylation des Ser359 et Ser364 par Erk1/2 (Brondello *et al.*, 1999). Ces modifications post-traductionnelles préviennent de la dégradation de la protéine par le protéasome. En activant la voie p44/p42 MAPK, nous avons montré que la CyPB induit l'expression de MKP-1 qui se maintient à des taux importants après plusieurs heures d'induction par la CyPB.

L'implication de MKP-1 dans la régulation de l'expression de facteurs inflammatoires a été largement démontrée *in vitro* comme *in vivo* (Xiao *et al.*, 2002 ; Shepherd *et al.*, 2004 ; Nimah *et al.* 2005 ; Chi *et al.*, 2006 ; Salojin *et al.*, 2006). Dans le cas d'une activation par le LPS, il a été démontré que les substrats préférentiels de MKP-1 sont p38 MAPK et JNK, même si Erk1/2 peuvent également être régulées par la phosphatase (Franklin & Kraft, 1997 ; Owens & Keyse, 2007). Dès lors, nous avons vérifié que la CyPB induit la déphosphorylation de p38 MAPK induite le LPS, ce qui démontre que la phosphatase induite par la CyPB est active et que l'action de la CyPB vise les MAPK qui sont des éléments clés de l'activation du macrophage.

L'activation de la voie p38 MAPK est essentielle à l'expression du TNF- $\alpha$  en agissant sur la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'ARNm. En effet, elle stabilise les ARNm au niveau des éléments ARE et active des facteurs de transcription tels que Elk-1, ATF-2 et NF- $\kappa$ B. Les travaux de Xiao *et al.* (2002) ont démontré que l'inhibition de p38 MAPK par un dominant négatif bloque l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B. Campbell *et al.* (2004) ont confirmé ces résultats en montrant que cette kinase régule l'activité transactivatrice de NF- $\kappa$ B. Elle peut également agir sur la translocation de ce facteur de transcription au noyau. De façon à prouver le rôle transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel de la CyPB, nous envisageons d'utiliser des gènes rapporteurs où l'expression de la luciférase est sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$ , seul ou en association avec la région 3'UTR.

Par ailleurs, le TNF- $\alpha$  n'est pas le seul facteur régulé par la CyPB. Nos résultats démontrent que la CyPB inhibe la synthèse de la chimiokine RANTES, dont l'expression est connue pour être régulée par NF- $\kappa$ B et JNK (Pradervand *et al.*, 2006). Comme nous l'avons fait pour p38 MAPK, il est nécessaire de regarder l'effet de la CyPB sur l'activation de JNK. Ces données conforteront l'hypothèse d'une activité transcriptionnelle de la CyPB dépendante de la désactivation de p38 et de JNK.

L'implication de MKP-1 dans l'activité de la CyPB semble indéniable. Néanmoins, nos résultats ne permettent pas d'affirmer si la CyPB agit par cet unique mécanisme. En effet, de nombreux processus sont mis en place par les macrophages pour éviter l'emballement de la réaction inflammatoire (figure 18). En outre, les facteurs anti-inflammatoires potentialisent leurs effets en régulant différentes voies de signalisation. Ainsi, le TGF- $\beta$ 1 induit une diminution de l'expression du CD14 et la surexpression de MKP-1 et de TTP (Imai *et al.*, 2000 ; Xiao *et al.*, 2002 ; Ogawa *et al.*, 2003). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de MKP-1 et de siRNA dirigés contre la phosphatase permettra d'évaluer l'importance de ce mécanisme dans l'effet de la CyPB.

Nous avons vérifié par cytofluorimétrie en flux qu'un pré-traitement de 16 h par la CyPB ne modifie pas l'expression du CD14 et du TLR4. En revanche, la CyPB pourrait agir au niveau de différents points de contrôle en aval des récepteurs du LPS. Elle pourrait induire l'expression de protéines cytosoliques comme SOCS-1 ou favoriser la formation des homodimères p50-p50 et p52-p52, qui sont des répresseurs de la transcription. En parallèle, en agissant directement sur l'expression des facteurs de régulation de la stabilité des ARNm comme TTP, la CyPB pourrait potentialiser leur effet post-transcriptionnel. Enfin, la sécrétion

de facteurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ 1 est un bon moyen de réguler les effets du LPS. Ainsi, les effets de la CyPB pourraient être en partie indirects si elle induit l'expression ou l'activation de ces facteurs anti-inflammatoires. Un tel mécanisme a déjà été décrit par Pilette *et al.* (2002) à propos de l'IL-9, dont l'activité anti-inflammatoire est dépendante de l'expression du TGF- $\beta$ 1.

Le TGF- $\beta$ 1 est un bon candidat pour expliquer l'activité de la CyPB. En effet, il a été récemment démontré au laboratoire que la CyPB stimule l'activité immunosuppressive des lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, par un mécanisme dépendant de l'expression membranaire du TGF- $\beta$ 1. Malheureusement, dans le modèle cellulaire que nous utilisons, l'étude de l'effet de la CyPB sur l'expression du TGF- $\beta$ 1 n'a pas été concluante, car l'expression basale de son ARNm est forte dans les cellules. Cette surexpression semble due à la différenciation par la vitamine D3 (Koli *et al.*, 1993). Par ailleurs, le test ELISA utilisé n'a permis de détecter aucune variation significative de l'expression du TGF- $\beta$ 1 dans les surnageants de cellules incubées ou non par de la CyPB. Afin d'incriminer ou non tout effet du TGF- $\beta$ 1 dans l'activité de la CyPB, nous envisageons de reproduire nos expériences en utilisant des macrophages primaires issus de monocytes du sang.

La découverte de l'activité immunorégulatrice de la CyPB démontre son implication dans la modulation des réponses des macrophages. Dans la phase d'initiation de la réponse inflammatoire, la CyPB interviendrait directement dans le recrutement de sous-populations leucocytaires. Dans un deuxième temps, elle favoriserait un retour à l'homéostasie en régulant la synthèse de facteurs inflammatoires. Lors de pathologies chroniques, de forts taux de TNF- $\alpha$  sont détectés en même temps qu'une sécrétion massive de CyPB. Cette constatation semble contradictoire à l'effet que nous venons de décrire. Néanmoins, dans ces pathologies, de fort taux de protéines anti-inflammatoires sont détectés sans que leur efficacité soit prouvée. Il semble que les effets modulateurs de la CyPB soient largement dépendants du contexte physiopathologique et de la balance entre facteurs pro- et anti-inflammatoires.

# Bibliographie

---

- Abraham R.T. (1998) Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr. Opin Immunol.* **10**(3), 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**(15), 7144-7148
- Ahrens T., Sleeman J.P., Schempp C.M., Howells H., Hofmann M., Ponta 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**(26), 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**(8), 5876-5882
- Al-Daraji W.I., Grant K.R., Ryan K., Saxton A. and Reynolds N.J. (2002) Localisation of calcineurin/NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcineurin/NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A. *J. Invest. Dermatol.*, **118**(5), 779-788
- Alexopoulou A.N., Multhaupt H.A. and Couchman J.R. (2007) Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**(3), 505-528
- 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**(24), 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**(1), 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**(Pt 2), 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**(3), 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**(5), 2714-2719
- Allen A., Zheng Y., Gardner L., Safford M., Horton M.R. and Powell J.D. (2004) The novel cyclophilin binding compound, sanglifohrin A, disassociates G1 cell cycle arrest from tolerance induction. *J. Immunol.* **172**(8), 4797-803
- 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**(2), 542-546
- Anderson P., Phillips K., Stoecklin G. and Kedersha N. (2004) Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *J. Leukoc. Biol.* **76**(1), 42-47
- Andres J.L., Stanley K., Cheifetz S. and Massagué J. (1989) Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* **109**(6 Pt 1), 3137-3145
- Aouali N., Eddabra L., Macadre J. and Morjani H. (2005) Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **56**(1), 61-70
- 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**(1), 113-125
- Arévalo-Rodríguez M. and Heitman J. (2005) Cyclophilin A is localized to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**(1), 17-29

- Arora K., Gwinn W.M., Bower M.A., Watson A., Okwumabua I., MacDonald H.R., Bukrinsky M.I. and Constant S.L. (2005) Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J. Immunol.* **175**(1), 517-522
- Asundi V.K. and Carey D.J. (1995) Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region. *J. Biol. Chem.* **270**(44), 26404-26410
- 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**(1), 145-153
- 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**(1 Pt 1), 662-664
- 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**(Pt 2), 315-324
- Badger A.M., Bradbeer J.N., Votta B., Lee J.C., Adams J.L. and Griswold D.E. (1996) Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**(3), 1453-1461
- Baines C.P., Kaiser R.A., Purcell N.H., Blair N.S., Osinska H., Hambleton M.A., Brunskill E.W., Sayen M.R., Gottlieb R.A., Dorn G.W., Robbins J. and Molkenkin J.D. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, **434**(7033), 658-662
- Bajorath J. (2000) Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* **39**(2), 103-111
- Baker E.K., Colley N.J. and Zuker C.S. (1994) The cyclophilin homolog Nina A functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein rhodopsin. *EMBO J.* **13**(20), 4886-4895
- Balastik M., Lim J., Pastorino L. and Lu K.P. (2007) Pin1 in Alzheimer's disease: multiple substrates, one regulatory mechanism? *Biochim. Biophys. Acta.* **1772**(4), 422-429
- Bang H., Muller W., Hans M., Brune K. and Swandulla D. (1995) Activation of Ca<sup>2+</sup> signaling in neutrophils by the mast cell-released immunophilin FKBP12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**(8), 3435-3438
- Barik S. (2006) Immunophilins: for the love of proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **63**(24), 2889-2900
- Barragan A., Spillmann D., Carlson J. and Wahlgren M. (1999) Role of glycans in *Plasmodium falciparum* infection. *Biochem. Soc. Trans.* **27**(4), 487-493
- Barre J. (1992) Les formes circulantes de la cyclosporine A. *Therapie* **47**(4), 301-304
- 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**(12), 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**(Pt 1), 1-15
- Beauvais D.M. and Rapraeger A.C. (2004) Syndecans in tumor cell adhesion and signaling., *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**, 3
- Belting M., Borsig L., Fuster M.M., Brown J.R., Persson L., Fransson L-A. and Esko J.D. (2002) Tumor anuaction by combined heparan sulfate and polyamine depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**(1), 371-376
- Bennett K.L., Jackson D.G., Simon J.C., Tanczos E., Peach R., Modrell B., Stamenkovic I., Plowman G. and Aruffo A. (1995) CD44 isoforms containing exon v3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J. Cell. Biol.* **128**(4), 687-698
- 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**(46), 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**(34), 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.E., 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**(4980), 556-559
- 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**(23), 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**(2), 439-445
- 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**(4), 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**(5), 975-980
- Biswas C. (1982) Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**(3), 1026-1034
- Biswas C. (1984) Collagenase stimulation in cocultures of human fibroblasts and human tumor cells. *Cancer Lett.* **24**(2), 201-207
- Biswas C., Zhang Y., DeCastro R., Guo H., Nakamura T., Kataoka H., and Nabeshima K. (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory (recalled EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* **55**(2), 434-439
- Bjelogrlic S.K., Srdic T. and Radulovic S. (2006) Mammalian target of rapamycin is a promising target for novel therapeutic strategy against cancer. *J. BUON.* **11**(3), 267-276
- Blobe G.C., Liu X., Fang S.J., How T. and Lodish H.F. (2001) A novel mechanism for regulating transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *J. Biol. Chem.* **276**(43), 39608-39617
- Bobardt M.D., Saphire A.C., 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**(1), 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**(4), 468-475
- Borel J.F. (1989) The cyclosporins. *Transplant Proc.* **21**(1 Pt 1), 810-815
- Boulos S., Meloni B.P., Arthur P.G., Majda B., Bojarski C. and Knuckey N.W. (2007) Evidence that intracellular cyclophilin A and cyclophilin A/CD147 receptor-mediated ERK1/2 signalling can protect neurons against in vitro oxidative and ischemic injury. *Neurobiol. Dis.* **25**(1), 54-64
- Bourguignon L.Y., Zhu D. and Zhu H. (1998) CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front. Biosci.* **3**, 637-649
- Bourguignon L.Y., 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**(4), 269-287
- Bourguignon L.Y., Zhu H., Sha L. and Chen Y.W. (2000) CD44 interaction with Tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J. Biol. Chem.* **275**(3), 1829-1838

- Bourguignon L.Y., 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**(10), 7327-7336
- Bourguignon L.Y., 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.* **276**(52), 48679-48692
- Braaten D., Franke E.K. and Luban J. (1996) 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**(6), 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**(3), 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**(6), 1300-1309
- Bram R.J., Hung D.T., Martin P.K., Schreiber S.L. and Crabtree G.R. (1993) Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Mol. Cell Biol.* **13**(8), 4760-4769
- Bram R.J. & Crabtree G.R. (1994) Calcium signaling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* **371**(6495), 355-358
- Brazin K.N., Mallis R.J., Fulton D.B. and Andreotti A.H. (2002) Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**(4), 1899-1904
- Brondello J.M., Pouyssegur J. and McKenzie F.R. (1999) Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* **286**(5449), 2514-2517
- 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**(8), 2115-2125
- Burns K., Janssens S., Brissoni B., Olivos N., Beyaert R. and Tschopp J. (2003) Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* **197**(2), 263-268
- Buttini M., Limonta S., Luyten M. and Boddeke H. (1995) Distribution of calcineurin A isoenzyme mRNAs in rat thymus and kidney. *Histochem. J.* **27**(4), 291-299
- Cai S., Bulus N., Fonseca-Siesser P.M., Chen D., Hanks S.K., Pozzi A. and Zent R. (2005) CD98 modulates integrin beta1 function in polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* **118**(Pt 5), 889-899
- Campbell J., Ciesielski C.J., Hunt A.E., Horwood N.J., Beech J.T., Hayes L.A., Denys A., Feldmann M., Brennan F.M. and Foxwell B.M. (2004) A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **173**(11), 6928-6937
- Candé C., Vahsen N., Kouranti I., Schmitt E., Daugas E., Spahr C., Luban J., Kroemer R.T., Giordanetto F., Garrido C., Penninger J.M. and Kroemer G. (2004) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* **23**(8), 1514-1521
- Capurro M.I., Xiang Y.Y., Lobe C. and Filmus J. (2005) Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical wnt signaling. *Cancer Res.* **65**(14), 6245-6254
- Cardin A.D. & Weintraub H.J. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis.* **9**(1), 21-32
- Carey D.J. (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* **327**(Pt 1), 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**(17), 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**(16), 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**(1), 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**(12), 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**(16), 5222-5229
- Caudroy S., Polette M., Nawrocki-Raby B., Cao J., Toole B.P., Zucker S. and Birembaut P. (2002) EMMPRIN-mediated MMPs in tumor and endothelial cells. *Clin. Exp. Metastasis* **19**(8), 697-702
- Chandrasekaran S., Guo N.H., Rodrigues R.G., Kaiser J. and Roberts D.D. (1999) Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J. Biol. Chem.* **274**(16), 11408-11416
- Charnaux N., Brule S., Hamon M., Chaigneau T., Saffar L., Prost C., Lievre N. and Gattegno L. (2005) Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/ CXCL12. *FEBS J.* **272**(8), 1937-1951
- Chaudhuri P., Colles S.M., Fox P.L. and Graham L.M. (2005) Protein kinase C $\delta$ -dependent phosphorylation of syndecan-4 regulates cell migration. *Circ. Res.*, **97**(7), 674-681
- Chen R.L. & Lander A.D. (2001) Mechanisms underlying preferential assembly of heparan sulfate on glypican-1. *J. Biol. Chem.* **276**(10), 7507-7517
- Chen P., Li J., Barnes J., Kokkonen G.C., Lee J.C. and Liu Y. (2002) Restraint of proinflammatory cytokines biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* **169**(11), 6408-6416
- Chen L., Klass C. and Woods A. (2004) Syndecan-2 regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling., *J. Biol. Chem.* **279**(16), 15715-15718
- Chen X., Lin J., Kanekura T., Su J., Lin W., Xie H., Wu Y., Li J., Chen M. and Chang J. (2006) A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma. *Cancer Res.* **66**(23), 11323-11330
- Chi H., Barry S.P., Roth R.J., Wu J.J., Jones E.A., Bennett A.M. and Flavell R.A. (2006) Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(7), 2274-2279
- Chiampanichayakul S., Peng-in P., khunkaewla P., Stockinger H. and Kasinrerak W. (2006) CD147 contains different bioactive epitopes involving the regulation of cell adhesion and lymphocyte activation. *Immunobiology* **211**(3), 167-178
- Chillarón J., Roca R., Valencia A., Zorzano A. and Palacín M. (2001) Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **281**(6), F995-1018
- 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**(2), 156-163
- Chiu R., Rey O., Zheng J.Q., Twiss J.L., Song J., Pang S. and Yokoyama K.K. (2003) Effects of altered expression and localization of cyclophilin A on differentiation of p19 embryonic carcinoma cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **23**(6), 929-943
- Chklovskaja E., Nissen C., Landmann L., Rahner C., Pfister O. and Wodnar-Filipowicz A. (2001) Cell-surface trafficking and release of Flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor gamma-chain signaling and inhibited by cyclosporin A. *Blood* **97**(4), 1027-1034
- 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**(2), 374-382

- Cho J.Y., Skubitz K.M., Katz D.R. and Chain B.M. (2003) CD98-dependent homotypic aggregation is associated with translocation of protein kinase Cdelta and activation of mitogen-activated protein kinases. *Exp. Cell Res.* **286**(1), 1-11
- Choi S., Lee E., Kwon S., Park H., Yi J.Y., Kim S., Han I-O., Yun Y. and Oh E-S. (2005) Transmembrane domain-induced oligomerisation is crucial for the functions of syndecans- and -4. *J. Biol. Chem.* **280**(52), 42573-42579
- Cirillo R., Triggiani M., Siri L., Ciccarelli 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**(10), 3891-3897
- 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**(1), 129-138
- Colgan J., Yuan H.E., 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**(7), 4299-4310
- Colgan J., Asmal M., Neagu M., Yu B., Schneidkraut J., Lee Y., sokolskaja E., Andreotti A. and Luban J. (2004) Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4<sup>+</sup> T cells via a proline-directed conformational switch in Itk. *Immunity* **21**(2), 189-201
- Colley N.J., Baker E.K., Stamnes M.A. and Zuker C.S. (1991) The cyclophilin homolog nina A is required in the secretory pathway. *Cell* **67**(2), 255-263
- 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**(Pt 2), 381-385
- Corbit K.C., Foster D.A. and Rosner M.R. (1999) Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell Biol.* **19**(6), 4209-4218
- Coste I., Gauchat J-F., Wilson A., Izui S., Jeannin P., Delneste Y., MacDonald H.R., Bonnefoy J.Y. and Renno T. (2001) Unavailability of CD147 leads to erythrocyte trapping in the spleen. *Red Cells* **97**(12), 3984-3988
- Couchman J.R. (2003) Syndecans : proteoglycan regulators of cell-surface microdomains ? *Nature Reviews* **4**(12), 926-937
- Crompton M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**(Pt 2), 233-249
- Damsker J.M., Bukrinsky M.I. and Constant S.L. (2007) Preferential chemotaxis of activated human CD4<sup>+</sup> T cells by extracellular cyclophilin A. *J. Leukoc. Biol.* **82**(3), 613-618
- Danielson P.E., Forss-Petter S., Brow M.A., Calavetta L., Douglass J., Milner R.J. and Sutcliffe J.G. (1988) p1B15 : A cDNA of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* **7**(4), 261-267
- Davidson B., Goldberg I., Berner A., Kristensen G., and Reich R. (2003) EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serious ovarian carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis.* **20**(2), 161-169
- Day R.M., Mitchell T.J., Knight S.C. and Forbes A. (2006) regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine* **21**(5), 224-233
- 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, and its release from the cell surface by metalloproteinases. *Arthritis Rheum.* **48**(8), 2197-2206
- Dean J.L., Sully G., Clark A.R. and Saklatvala J. (2004) The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell. Signal.* **16**(10), 1113-1121
- Deleault K.M., Skinner S.J. and Brooks S.A. (2007) Tristetraprolin regulates TNF TNF- $\alpha$  mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways., *Mol. Immunol.* **45**(1), 13-24

- 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**(43), 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**(3), 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**(14), 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**(Pt 1), 235-244
- Denhez F., Wilcox-Adelman S.A., Baciu 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**(14), 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**(4), 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**(Pt 3), 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**(8), 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**(4), 1405-1410
- Dietrich L., Ehrlich L.S., LaGrassa T.J., Ebbets-Reed D. and Carter C. (2001) Structural consequences of cyclophilin A binding on maturational refolding in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J. Virol.* **75**(10), 4721-4733
- 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**(6), 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**(50), 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**(36), 33353-33360
- Dolinski K., Muir S., Cardenas M. and Heitman J. (1997) All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**(24), 13093-13098
- 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**(9), 7110-7113
- Doyle V., Virji S. and Crompton M. (1999) Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress. *Biochem. J.* **341**(Pt 1), 127-132
- Dumitru C.D., Ceci J.D., Tsatsanis C., Kontoyiannis D., Stamatakis K., Lin J.H., Patriotis C., Jenkins N.A., Copeland N.G., Kollias G. and Tschlis P.N. (2000) TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**(7), 1071-1083

- Dumont F.J., Staruch M.J., Koprak S.L., 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**(1), 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**(4), 1079-1085
- 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**(7), 2591-2598
- Eberhardt W., Doller A., Akool el-S. and Pfeilschifter J. (2007) Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol. Ther.* **114**(1), 56-73
- 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**(Pt 20), 3433-3441
- Eickelberg O., Centrella M., Reiss M., Kashgarian M. and Wells R.G. (2002) Betaglycan inhibits TGF- $\beta$  signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J. Biol. Chem.* **277**(1), 823-829
- Elenius K., Määttä A., Salmivirta M. and Jalkanen M. (1992) Growth factors induce 3T3 cells to express bFGF-binding syndecan. *J. Biol. Chem.* **267**(9), 6435-6441
- Ellis S.M., Nabeshima K. and Biswas C. (1989) Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell-derived collagenase stimulatory factor. *Cancer Res.* **49**(12), 3385-3391
- Endo K., Takino T., Miyamori H., Kinsen H., Yoshizaki T., Furukawa M. and Sato H. (2003) Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J. Biol. Chem.* **278**(42), 40764-40770
- Endrich M.M. and 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**(3), 441-446
- Endrich M.M., Gehrig P. and Gehring H. (1999) Maturation-induced conformational changes of HIV-1 capsid protein and identification of two high affinity sites for cyclophilins in the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **274**(9), 5326-5332
- Enerson B.E. and Drewes L.R. (2003) Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **92**(8), 1531-1544
- Erdman R., Stahl R.C., Rothblum K., Chernousov M.A. and Carey D.J. (2002) Schwann cell adhesion to a novel heparan sulfate binding site in the N-terminal domain of alpha 4 type V collagen is mediated by syndecan-3. *J. Biol. Chem.* **277**(9), 7619-7625
- Esko J.D. & Lindahl U. (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.* **108**(2), 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**(1), 53-67
- Ethell I.M., Irie F., Kalo M.S., Couchman J.R., Pasquale E.B. and Yamaguchi Y. (2001) EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron.* **31**(6), 1001-1013
- Fadool J.M. and Linser P.J. (1996) Evidence for the formation of multimeric forms of the 5A11/HT7 antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**(1), 280-286
- Fan Q.W., Yuasa S., Kuno N., Senda T., Kobayashi M., Muramatsu T. and Kadomatsu K. (1998) Expression of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in the mouse central nervous system. *Neurosci. Res.* **30**(1), 53-63
- Fears C.Y. and Woods A. (2006) The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol.* **25**(7), 443-456
- Fenczik C.A., Sethi T., Ramos J.W., Hughes P.E. and Ginsberg M.H. (1997) Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature* **390**(6655), 15-17

- Fenczik C.A., Zent R., Dellos M., Calderwood D.A., Satriano J., Kelly C. and Ginsberg M.H. (2001) Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J. Biol. Chem.* **276**(12), 8746-8752
- Feral C.C., Nishiya N., Fenczik C.A., Stuhlmann H., Slepak M. and Ginsberg M.H. (2005) CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**(2), 355-360
- Filmus J. & Song H.H. (2000) in *R.V. Iozzo (Ed), Proteoglycans, Marcel Dekker, New-York* pp. 161-176
- Filmus J. & Selleck S.B. (2001) Glypicans : proteoglycans with a surprise. *J. Clin. Invest.* **108**(4), 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**(10), 1101-1111
- 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**(6206), 476-478
- 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
- Fitzgerald M.L., Wang Z., Park P.W., Murphy G. and Bernfield M. (2000) Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signalling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J. Cell Biol.* **148**(4), 811-824
- 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**(6338), 803-807
- Forster-Horváth C., Bocsi J., Rásó E., Orbán T.I., Olah E., Timár J. and Ladányi A. (2001) Constitutive intracellular expression and activation-induced cell surface up-regulation of CD44v3 in human lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **31**(2), 600-608
- Franke E.K., Yuan H.E. and Luban J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**(6504), 359-362
- Franklin C.C. and Kraft A.S., (1997), Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J. Biol. Chem.* **272**(27), 16917-16923
- Fransson L.A., Edgren G., Havsmark B. and Schmidtchen A. (1995) Recycling of a glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulphate proteoglycan (glypican) in skin fibroblasts. *Glycobiology*, **5**(4), 407-415
- 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-Å., Belting M., Cheng F., Jönsson M., Mani K. and Sandgren S. (2004) Novel aspects of glypican glycobiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**(9), 1016-1024
- 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
- 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**(4), 799-806
- Fruman D.A., Mather P.E., Burakoff S.J. and Bierer B.E. (1992a) Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas. *Eur. J. Immunol.* **22**(10), 2513-2517
- Fruman D.A., Klee C.B., Bierer B.E. and Burakoff S.J. (1992b) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**(9), 3686-3690
- Fujihara M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azuma H. and Ikeda H. (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide : roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.* **100**(2), 171-194
- Fuki I.V., Kuhn K.M., Lomazov I.R., Rothman V.L., Tuszyński G.P., Iozzo R.V., Swenson T.L., Fisher E.A. and Williams K.J. (1997) The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. *J. Clin. Invest.* **100**(6), 1611-1622

- Gabison E.E, Hoang-Xuan T., Mauviel A. and Menashi S. (2005) EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer development and tissue repair. *Biochimie* **87**(3-4), 361-368
- Galat A. (1993) Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur. J. Biochem.* **216**(3), 689-707
- Galat A. & Bouet F. (1994) Cyclophilin-B is an abundant protein whose conformation is similar to cyclophilin-A. *FEBS Lett.* **347**(1), 31-36
- Galat A. & Metcalfe S.M. (1995) Peptidylproline cis/trans isomerases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **63**(1), 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**(2), 149-162
- Galat A. (2000) Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *Eur. J. Biochem.* **267**(16), 4945-4959
- Galeazzi M., Bellisai F., Manganelli S., Morozzi G. and Sebastiani G.D. (2006) Cyclosporine A for the treatment of autoimmune disorders in HCV infected patients. *Autoimmun. Rev.* **5**(7), 493-498
- 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
- Gamble T.R., Vajdos F.F., Yoo S., Worthylake D.K., Houseweart M., Sundquist W.I. and Hill C.P. (1996) Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* **87**(7), 1285-1294
- 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**(3), 373-379
- García-Echeverría C., Kofron J.L., Kuzmic P. and Rich D.H. (1993) A continuous spectrophotometric direct assay for peptidyl prolyl cis-trans isomerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**(1), 70-75
- Gengrinovitch S., Berman B., David G., Witte L., Neufeld G. and Ron D. (1999) Glypican-1 is a VEGF165 binding proteoglycan that acts as an extracellular chaperone for VEGF165. *J. Biol. Chem.* **274**(16), 10816-10822.
- Gething MJ and Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature.* **355**(6355), 33-45
- Ghosh S. and Karin M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**, Suppl:S81-96
- Gold L.I. (1999) The role for transforming growth factor-beta (TGFβ) in human cancer. *Crit. Rev. oncog.* **10**(4), 303-360
- Gold B.G. (2000) Neuroimmunophilin ligands: evaluation of their therapeutic potential for the treatment of neurological disorders. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **9**(10), 2331-2342
- 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**(3), 518-522
- Gothel S.F., Scholz C., Schmid F.X. and Marahiel M.A. (1998) Cyclophilin and trigger factor from *Bacillus subtilis* catalyze in vitro protein folding and are necessary for viability under starvation conditions. *Biochemistry* **37**(38), 13392-13399
- Götte M. (2003) Syndecans in inflammation. *FASEB J.* **17**(6), 575-591
- Götte M. and Yip G.W. (2006) Heparanase, hyaluronan, and CD44 in Cancers : a Breast carcinoma perspective. *Cancer Res.* **66**(21), 10233-10237
- Granelli-Piperno A. (1988) In situ hybridization for interleukin 2 and interleukin2 receptor mRNA in T cells activated in the presence or absence of cyclosporin A. *J. Exp. Med.* **168**(5), 1649-1658
- Granès F., Garcia R., Casaroli-Marano R.P., Castel S., Rocamora N., Reina M., Urena J.M. and Vilaro S. (1999) Syndecan-2 induces filopodia by active cdc42Hs. *Exp. Cell Res.* **248**(2), 439-456



- Granés F., Urena J.M., Rocamora N. and Vilaro S. (2000) Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 7), 1267-1276
- Granès F., Berndt C., Roy C., Mangeat P., Reina M. and Vilaro S. (2003) Identification of a novel ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain. *FEBS Lett.* **547**(1-3), 212-216
- 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 release defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology*, **257**(1), 247-260
- 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**(4), 2511-2517
- 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**(1), 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**(25), 13683-13688
- Gschwendt M. (1999) Protein kinase C delta. *Eur. J. Biochem.* **259**(3), 555-564
- Guha M. and Mackman N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **13**(2), 85-94
- Guo H., Zucker S., Gordon M.K., Toole B.P. and Biswas C. (1997) Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **272**(1), 24-27
- Gwinn W.M., Damsker J.M., Falahati R., Okwumabua I., Kelly-Welsh A., Keegan A.D., Vanpouille C., Lee J.J., Dent L.A., Leitenberg D., Bukrinsky M.I. and Constant S.L. (2006) Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J. Immunology* **177**(7), 4870-4879
- Haendler B., Hofer-Warbinek R. and Hofer E. (1987) Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO J.* **6**(4), 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**(3), 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**(2), 159-171
- Halestrap A.P. and Price N.T. (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J.* **343** (Pt 2), 281-299
- Hammer M., Mages J., Dietrich H., Servatius A., Howells N., Cato A.C. and Lang R. (2006) Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J. Exp. Med.* **203**(1), 15-20
- Hamon M., Mbemba E., Charnaux N., Slimani H., Brule S., Saffar L., Vassy R., Prost C., Lievre N., Starzec A. and Gattegno L. (2004) A syndecan-4/CXCR4 complex expressed on human primary lymphocytes and macrophages and HeLa cell lines binds the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Glycobiology* **14**, 311-323.
- 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**(4674), 544-547
- Hanna S.M., Kirk P., Holt O.J., Puklavec M.J., Brown M.H. and Barclay A.N. (2003) A novel form of the membrane protein CD147 that contains an extra Ig-like domain and interacts homophilically, *BMC Biochem.* **4**, 17

- Hanouille X., Melchior A., Sibille N., Parent B., Denys A., Wieruszeski J.M., Horvath D., Allain F., Lippens G. and Landrieu I. (2007) Structural and functional characterisation of the interaction between cyclophilin B and A heparin derived oligosaccharide. *J. Biol. Chem.* Sous presse
- Hansson M.J., Mattiasson G., Mansson R., Karlsson J., Keep M.F., Waldmeier P., Ruegg U.T., Dumont J.M., Besseghir K. and Elmer E. (2004) The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**(4), 407-413
- Harding M.W., Handschumacher R.E. and Speicher D.W. (1986) Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **261**(18), 8547-8555
- Harding M.W. & Handschumacher R.E. (1988) Cyclophilin, a primary molecular target for cyclosporine. Structural and functional implications. *Transplantation* **46**(2 suppl), 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**(6244), 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**(16), 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**(2), 131-137
- Hartwig S., Hu M.C., Cella C., Piscione T., Filmus J. and Rosenblum N.D. (2005) Glypican-3 modulates inhibitory Bmp2-Smad signaling to control renal development in vivo. *Mech Dev.* **122**(7-8), 928-938
- Hasel K.W. and Sutcliffe J.G. (1990) Nucleotide sequence of a cDNA coding for mouse cyclophilin. *Nucleic Acids Res.* **18**(13), 4019
- Hasel K.W., Glass J.R., Godbout M. and Sutcliffe J.G. (1991) An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin. *Mol. Cell. Biol.* **11**(7), 3484-3491
- Heitman J., Movva N.R. and Hall M.N. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**(5022), 905-909
- Helekar S.A. and Patrick J. (1997) Peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin A in functional homo-oligomeric receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **94**(10), 5432-5437
- Hesterkamp T., Hauser S., Lütcke 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**(9), 4437-4441
- Hilgard P. and Stockert R. (2000) Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* **32**(5), 1069-1077
- Higuchi S., Tabata N., Tajima M., Ito M., Tsurudome M., Sudo A., Uchida A. and Ito Y. (1998) Induction of human osteoclast-like cells by treatment of blood monocytes with anti-fusion regulatory protein-1/CD98 monoclonal antibodies. *J. Bone Miner. Res.* **13**(1), 44-49
- Hoffmann K. and Handschumacher R.E. (1995) Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90. *Biochem. J.* **307**(Pt 1), 5-8
- Holloway M.P. & Bram R.J. (1996) A hydrophobic domain of Ca<sup>2+</sup>-modulating cyclophilin ligand modulates calcium influx signaling in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **271**(15), 8549-8552
- Holloway M.P. & Bram R.J. (1998) Co-localization of calcium-modulating cyclophilin ligand with intracellular calcium pools. *J. Biol. Chem.* **273**(26), 16346-16350
- Horowitz A. and Simons M. (1998) Regulation of syndecan-4 phosphorylation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**(18), 10914-10918
- 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**(48), 15871-15877
- 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**(3), 229-235

- Hsu V.L., Heald S.L. and 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**(1), 131-140
- Hsu H.C., Cheng W., Lai P.L. (1997) Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res.* **57**(22), 5179-5184
- 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**(1), 139-151
- Hu J.H., Chen T., Zhuang Z.H., Kong L., Yu M.C., Liu Y., Zang J.W. and Ge B.X. (2007) Feedback control of MKP-1 expression by p38. *Cell Signal.* **19**(2), 393-400
- Huang T., Deng H., Wolkoff A.W. and Stockert R.J. (2002) Phosphorylation-dependant interaction of the asialoglycoprotein receptor with molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **277**(40), 37798-37803
- Huber L.C., Distler O., Turner I., Gay R.E., Gay S. and Pap T. (2006) synovial fibroblasts : key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **45**(6), 669-675
- Hübner D., Drakenberg T., Forsen S. and Fischer G. (1991) Peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activity as studied by dynamic proton NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* **284**(1), 79-81
- Husi H. & Zurini M.G. (1994) Comparative binding studies of cyclophilins to cyclosporin A and derivatives by fluorescence measurements. *Anal. Biochem.* **222**(1), 251-255
- Iba K., Albrechtsen R., Gilpin B., Fröhlich C., Loechel F., Zolkiewska A., Ishiguro K., Kojima T., Liu W., Langford J.K., Sanderson R.D., Brakebusch C., Fässler R. and Wewer U.M. (2000) The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J. Cell Biol.* **149**(5), 1143-1156
- 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**(2), 159-169
- Igakura T., Kadomatsu K., Taguchi O., Muramatsu H., Kaname T., Miyauchi T., Yamamura K., Arimura K. and Muramatsu T. (1996) Role of basigin, a member of immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**(1), 33-36
- Ilangumaran S., He H.T. and Hoessli D.C. (2000) Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins. *Immunol. Today* **21**, 2-7
- Imai K., Takeshita A. and Hanazawa S. (2000) Transforming growth factor-beta inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infect Immun.* **68**(5), 2418-2423
- Inoue T., Yoshida Y., Isaka Y. and Tagawa K. (1993) Isolation of mitochondrial cyclophilin from bovine heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**(3), 857-863
- Isacke C.M. & Yarwood H. (2002) The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**(7), 718-721
- 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**(10), 4708-4716
- Itano N., Oguri K., Nagayasu N., Kusano Y., Nakanishi H., David G. and Okayama M. (1996) Phosphorylation of a membrane-intercalated proteoglycan, syndecan-2, expressed in a stroma-inducing clone from a mouse Lewis lung carcinoma. *Biochem. J.* **315** ( Pt 3), 925-930
- Ivery M.T. (2000) Immunophilins : switched on protein binding domains ? *Med. Res. Rev.* **20**(6), 452-484
- Jackson D.G. (1997) Human leucocyte heparan sulphate proteoglycans and their roles in inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* **25**(1), 220-224

- Jain J., McCaffrey P.G., Valge-Archer V.E. and Rao A. (1992) Nuclear factor of activated T cells contains fos and jun. *Nature* **356**(6372), 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 NFAT p1 is a substrate for calcineurin and rejection. *Nature* **365**(6444), 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**(10), 3075-3084
- 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**(9), 789-796
- Jin Z.G., Lungu A., Xie L., Wang M., Wong C. and Berk B.C. (2004) Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**(7), 1186-1191
- Joseph J., Knobler R.L., Lublin F.D. and Burns F.R. (1993) Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and the putative adhesion molecule Basigin on murine cerebral endothelial cells by MHV-4 (JHM). *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**, 389-391
- Justice S.S., Hunstad D.A., Harper J.R., Duguay A.R., Pinkner J.S., Bann J., Frieden C., Silhavy T.J. and Hultgren S.J. (2005) Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **187**(22), 7680-7686
- 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**(5), 893-904
- Kaneider N.C., Reinisch C.M., Duzendorfer 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**(Pt 1), 227-236
- Kanekura T., Chen X. and Kanzaki T. (2002) Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int. J. Cancer* **99**(4), 520-528
- 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**(2), 184-192
- Kataoka H., DeCastro R., Zucker S. and Biswas C. (1993) Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res.* **53**(13), 3154-3158
- 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**(29), 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**(6), 691-697
- Kawai T., Adachi O., Ogawa T., Takeda K. and Akira S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**(1), 115-122
- Kay J.E. (1996) Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem. J.* **314**(Pt 2), 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**(21), 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**(2), 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**(8), 3324-3328

- Keyse S.M. (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **12**(2), 186-192
- Khunkeawla P., Moonsom S., Staffler G., Kongtawelert P. and Kasinrerak W. (2001) Engagement of CD147 molecule-induced cell aggregation through the activation of protein kinases and reorganization of the cytoskeleton. *Immunobiol.* **203**(4), 659-669
- Kieffer L.J., Thalhammer T. and Handschumacher R.E. (1992) Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein. *J. Biol. Chem.* **267**(8), 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**(17), 12303-12310
- Kim B.T., Kitagawa H., Tamura J., Saito T., Kusche-Gullberg M., Lindahl U. and Sugahara K. (2001) Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(13), 7176-7181
- Kim S.H., Lessner S.M., Sakurai Y. and Galis Z.S. (2004a) Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction. *Am. J. Pathol.* **164**(5), 1567-1574
- Kim H.J., Chong K.H., Kang S.W., Lee J.R., Kim J.Y., Hahn M.J. and Kim T.J. (2004b) Identification of cyclophilin A as a CD99-binding protein by yeast two-hybrid screening. *Immunol. Lett.* **95**(2), 155-159
- Kim H., Kim W-J., Jeon S-T., Koh E-M., Cha H-S., Ahn K-S. and Lee W.H. (2005) Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clin. Immunol.* **116**, 217-224
- Kim J., Lin J., Adam R.M., Lamb C., Shively S.B. and Freeman M.R. (2005a) An oxidative stress mechanism mediates chelerythrine-induced heparin-binding EGF-like growth factor ectodomain shedding. *J. Cell Biochem.* **94**(1), 39-49
- 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
- Kinne R.W., Bräuer R., Stuhlmüller B., Palombo-Kinne E. and Burmester G.R. (2000) Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **2**(3), 189-202
- 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**(2), 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**(17), 10702-10708
- Kirk P., Wilson M.C., Heddle C., Brown M.H., Barclay A.N., and Halestrap A.P. (2000) CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT-1 and MCT-4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J.* **19**(15), 3896-3904
- Kleeff J., Ishiwata T., Kumbasar A., Friess H., Buchler M.W., Lander A.D. and Korc M. (1998) The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. *J. Clin. Invest.* **102**(9), 1662-1673
- Kleeff J., Wildi S., Kumbasar A., Friess H., Lander A.D. and Korc M. (1999) Stable transfection of a glypican-1 antisense construct decreases tumorigenicity in PANC-1 pancreatic carcinoma cells. *Pancreas* **19**(3), 281-288
- Kock 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**(5), 777-786
- Kolesnikova T.V., Mannion B.A., Berditchevski F. and Hemler M.E. (2001) Beta1 integrins show specific association with CD98 protein in low density membranes. *BMC Biochem.* **2**, 10

- Koletsy A.J., Harding M.W. and Handschumacher R.E. (1986) Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J. Immunol.* **137**(3), 1054-1059
- Koli K. and Keski-Oja J. (1993) Vitamin D3 and calcipotriol enhance the secretion of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in cultured murine keratinocytes. *Growth Factors* **8**(2), 153-163
- 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**(4), 2313-2323
- Koltin Y., Faucette L., Bergsma D.J., Levy M.A., Cafferkey R., Koser P.L., Johnson R.K. and Livi G.P. (1991) Rapamycin sensibility in *Saccharomyces Cerevisiae* is mediated by a peptidyl cis-trans isomerase related to human FK-506-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **11**(3), 1718-1723
- Kontoyiannis D., Pasparakis M., Pizarro T.T., Cominelli F. and Kollias G. (1999) Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* **10**(3), 387-398
- Konttinen Y.T., Li T.F., Mandelin J., Liljestrom M., Sorsa T., Santavirta S. and Virtanen I. (2000) Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* **43**(2), 275-280
- Koo B.K., Jung Y.S., Shin J., Han I., Mortier E., Zimmermann P., Whiteford J.R., Couchman J.R., Oh E.S. and Lee W. (2006) Structural basis of syndecan-4 phosphorylation as a molecular switch to regulate signaling. *J. Mol. Biol.* **355**(4), 652-663
- Koser P.L., Bergsma D.J., Cafferkey R., Eng W.K., McLaughlin M.M., Ferrara A., Silverman C., Kasyan K., Bossard M.J., Johnson R.K., Porter T.G., Levy M.A. and Livi G.P. (1991) The CYP2 gene of *Saccharomyces Cerevisiae* encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase with an N-terminal sequence. *Gene* **108**(1), 73-80
- Kramer K.L. and Yost H.J. (2003) Heparan sulfate core proteins in cell-cell signaling. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 461-484
- Kroemer G., Zamzami N. and Susin S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**(1), 44-51
- Krummrei U., Bang R., Schmidtchen R., Brune K. and Bang H. (1995) Cyclophilin A is a zinc-dependent DNA binding protein in macrophages. *FEBS Lett.* **371**(1), 47-51
- Kung L. & Halloran P.F. (2000) Immunophilins may limit calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus at high drug concentrations. *Transplantation* **70**(2), 327-335
- Kusano Y., Oguri K., Nagayasu Y., Munusue S., Ishihara M., Saiki I., Yonekura H., Yamamoto H. and Okayama M. (2000) Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin alpha5beta1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Exp. Cell Res.* **256**(2), 434-444
- Kusano Y., Yoshimoto Y., Munusue S., Okayama M. and Oguri K. (2004) Cooperation of syndecan-2 and syndecan-4 among cell surface heparan sulfate proteoglycans in the actin cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma cells. *J. Biochem.* **135**(1), 129-137
- Kusche M., Oscarsson L.G., Reynertson R., Roden L. and Lindahl U. (1991) Biosynthesis of heparin. Enzymatic sulfation of pentasaccharides. *J. Biol. Chem.* **266**(12), 7400-7409
- Lane-Guermonprez L., Morot-Gaudry-Talarmain Y., Meunier F-M., O'Regan S., Onofri F., Le Caer J-P. and Benfenati F. (2005) Synapsin associates with cyclophilin B in an ATP- and cyclosporin-dependent manner. *J. Neurochem.* **93**(6), 1401-1411
- Lang K., Schmid F.X. and Fischer G. (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**(6136), 268-270
- Le Good J.A., Ziegler W.H., Parekh D.B., Alessi D.R., Cohen P. and Parker P.J. (1998) Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*, **281**(5385), 2042-2045
- 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**(5), 727-733

- Lebakken C.S. and Rapraeger A.C. (1996) Syndecan-1 mediates cell spreading in transfected human lymphoblastoid (Raji) cells. *J. Cell Biol.* **132**(6), 1209-1221
- Lebakken C.S., McQuade K.J. and Rapraeger A.C. (2000) Syndecan-1 signals independently of beta1 integrins during Raji cell spreading. *Exp. Cell Res.* **259**(2), 315-325
- Lee J.P., Palfrey H.C., Bindokas V.P., Ghadge G.D., Ma L., Miller R.J. and Roos R.P. (1999) The role of immunophilins in mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**(6), 3251-3256
- 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**(6), 399-407
- 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**(3), 423-431
- Li R., Huang L., Guo H. and Toole B.P. (2001) Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts. *J. Cell Physiol.* **186**(3), 371-379
- Li M., Zhai Q., Bharadwaj U., Wang H., Li F., Fischer W.E., Chen C. and Yao Q. (2006) Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147. *Cancer* **106**(10), 2284-2294
- Liang Y., 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**(4), 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**(1), 189-196
- Liew F.Y., Xu D., Brint E.K. and O'Neill L.A. (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Na. Rev. Immunol.* **5**(6), 446-458
- Lim M., Martinez T., Jablons D., Cameron R., Guo H., Toole B., Li J.D. and Basbaum C. (1998) Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. *FEBS Lett.* **441**(1), 88-92
- Lim S.T., Longley R.L., Couchman J.R. and Woods A. (2003) Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC alpha) increases focal adhesion localization of PKC alpha. *J. Biol. Chem.* **278**(16), 13795-13802
- Lin L.N., Hasumi H. and Brandts J.F. (1988) Catalysis of proline isomerization during protein-folding reactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **956**(3), 256-266
- Lin H., Huber R., Schlessinger D. and Morin P.J. (1999) Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* **59**(4), 807-810
- Lin D.T. & Lechleiter J.D. (2002) Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J. Biol. Chem.* **277**(34), 31134-31141
- Lin T.Y. and Emerman M. (2006) Cyclophilin A interacts with diverse lentiviral capsids. *Retrovirology.* **3**, 70
- Lindholm A. (1991a) Therapeutic monitoring of cyclosporine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **41**(4), 273-281
- Lindholm A. (1991b) Factors influencing the pharmacokinetics of cyclosporin in man. *Ther. Drug Monit.* **13**(6), 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**(6), 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**(4), 807-815

- Liu J., Shriver Z., Pope R.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**(36), 33456-33467
- Liu Y., Shepherd E.G. and Nelin L.D. (2007) MAPK phosphatases-regulating the immune response, *Nat. Rev. Immunol.* **7**(3), 202-212
- 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**(Pt 20), 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**(4), 785-795
- Lopes C.C., Dietrich C.P. and Nader H.B. (2006) Specific structural features of syndecans and haparn sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**(2), 157-167
- Lortat-Jacob H., Turnbull J.E. and Grimaud J.A. (1995) Molecular organization of the interferon  $\gamma$ -binding domain in heparin sulphate. *Biochem. J.* **310**(Pt 2), 497-505
- 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**(1), 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**(6738), 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**(6), 1067-1078
- 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**(7), 485-493
- Mammoto A., Takahashi K., Sasaki T. and Takai Y. (2000) Stimulation of Rho GDI release by ERM proteins. *Methods Enzymol.* **325**, 91-101
- Manoharan C., Wilson M.C., Sessions R.B. and Halestrap A.P. (2006) The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity. *Mol. Membr. Biol.* **23**(6), 486-498
- Manteca A. and Sanchez J. (2004) Recombinant cyclophilins lack nuclease activity. *J. bacteriol.* **186**(18), 6325-6326
- 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**(1), 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**(2), 340-345
- Marks A.R. (1996) Cellular functions of immunophilins. *Physiol. Rev.* **76**(3), 631-649
- Maruotti N., Cantatore F.P., Crivellato E., Vacca A. and Ribatti D. (2007) Macrophages in rheumatoid arthritis, *Histol Histopathol.* **22**(5), 581-586
- 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**(5), 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.* **1**(5), 428-434
- 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**(5134), 750-754
- 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**(2), 460-466



- 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**(5), 1305-1310
- Merlin D., Sitaraman S., Liu X., Eastburn K., Sun J., Kucharzik T., Lewis B. and Madara J.L. (2001) CD98-mediated links between amino acid transport and beta 1 integrin distribution in polarized columnar epithelia. *J. Biol. Chem.* **276**(42), 39282-39289
- Mi H., Kops O., Zimmermann E., Jäschke A. and Tropschug M. (1996) A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Lett.* **398**(2-3), 201-205
- Minder D., Böni J., Schüpbach J. and Gehring H. (2002) Immunophilins and HIV-1 infection. *Arch. Virol.* **147**(8), 1531-1542
- Miyamoto Y.J., Mitchell J.S. and McIntyre B.W. (2003) Physical association and functional interaction between beta1 integrin and CD98 on human T lymphocytes. *Mol. Immunol.* **39**(12), 739-751
- 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**(Pt 4), 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**(13), 9178-9185
- 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**(29), 18877-18880
- 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**(10), 6677-6684
- Mori K., Nishimura M., Tsurudome M., Ito M., Nishio M., Kawano M., Kozuka Y., Yamashita Y., Komada H., Uchida A. and Ito Y. (2004) The functional interaction between CD98 and CD147 in regulation of virus-induced cell fusion and osteoclast formation. *Med Microbiol Immunol.* **193**(4), 155-162
- Morimoto-Tomita M., Uchimura K., Werb Z., Hemmerich S. and Rosen S.D. (2002) Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in Mice and Humans. *J. Biol. Chem.*, **277**(51), 49175-49185
- Mosheimer B., Kaneider N.C., feistritz C., Djanani A.M., Sturn D.H., Patsch J.R. and Wiedermann C.J. (2005) Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**(5), 2964-2971
- Mulherin D., Fitzgerald O. and Bresnihan B. (1996) Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **39**(1), 115-124
- Mulloy B. & Forster M.J. (2000) Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology* **10**(11), 1147-1156
- Munesue S., Kusano Y., Oguri K., Itano N., Yoshitomi Y., Nakanishi H., Yamashina I. and Okayama M. (2002) The role of syndecan-2 in regulation of actin-cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma-derived metastatic clones. *Biochem. J.* **363**(Pt 2), 201-209
- Murakami M., Horowitz A., Tang S., Ware J. and Simons M. (2002) Protein kinase C (PKC) $\delta$  regulates PKC $\alpha$  activity in a syndecan-4 dependant manner. *J. Biol. Chem.* **277**(23), 20367-20371
- Nagai Y., Akashi S., Nagafuku M., Ogata M., Iwakura Y., Akira S., Kitamura T., Kosugi A., Kimoto M. and Miyake K. (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* **3**(7), 667-672
- 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**(8), 4281-4289

- Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T. and Tsujimoto Y. (2005) Cyclophilin D-dependant mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death., *Nature*, **434**(7033), 652-658
- Nakamura E., Sato M., Yang H., Miyagawa F., Harasaki M., Tomita K., Matsuoka S., Noma A., Iwai K. and Minato N. (1999) 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J. Biol. Chem.* **274**(5) 3009-3016
- Naor D. and Nedvetzki S. (2003) CD44 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **5**(3), 105-115
- Naruhashi K., Kadomatsu K., Igakura T., Fan Q.W., Kuno N., Muramatsu H., Miyauchi T., Hasegawa T., Itoh A., Muramatsu T. and Nabeshima T. (1997) Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking Bsg gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**(3), 733-737
- 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**(1-2), 151-155
- Nichols B.J. & Lippincott-Schwartz J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* **11**(10), 406-412
- Nichols B.J. (2002) A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* **4**(5), 374-378
- Nickel W. (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. *Eur. J. Biochem.* **270**(10), 2109-2119
- Nimah M., Zhao B., Denenberg A.G., Bueno O., Molkentin J., Wong H.R. and Shanley T.P. (2005) Contribution of MKP-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance. *Shock* **23**(1), 80-87
- Obata Y., Yamamoto K., Miyazaki M., Shimotohno K., Kohno S. and Matsuyama T. (2005) Role of the cyclophilin B in activation of onterferon regulatory factor-3. *J. Biol. Chem.* **280**(18), 18355-18360
- Ogawa K., Chen F., Kim Y.J. and Chen Y. (2003) Transcriptional regulation of tristetraprolin by transforming growth factor-beta in human T cells. *J. Biol. Chem.* **278**(32), 30373-303
- Ogawa T., Tsubota Y., Hashimoto J., Kariya Y. and Miyazaki K. (2007) The short arm of Laminin  $\gamma$ 2 chain of laminin-5 (Laminin-332) binds syndecan-1 and regulates cellular adhesion and migration by suppressing phosphorylation of integrin  $\beta$ 4 chain. *Mol. Biol. Cell* **18**(5), 1621-1633
- Oh E.S., Woods A. and Couchman J.R. (1997) Multimerization of the cytoplasmic domain of the syndecan-4 is required for its ability to activate proretein kinase C. *J. Biol. Chem.* **272**(18), 11805-11811
- 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**(17), 10624-10629
- Oh E.S. and Couchman J.R. (2004) Syndecans-2 and -4; Close cousins, but not identical twins. *Mol. Cells* **17**(2), 181-187
- Ohe Y., Ishikawa K., Itoh Z. and Tatemoto K. (1996) Cultured leptomeningeal cells secrete cerebrospinal fluid proteins. *J. Neurochem.* **67**(3), 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**(36), 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**(7), 1435-1446
- 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**(5), 1340-1345
- Owens D.M. and Keyse S.M. (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**(22), 3203-3213

- Paeshuyse J., Kaul A., De Clercq E., Rosenwirth B., Dumont J.M., Scalfaro P., Bartenschlager R. and Neyts J. (2006) The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* **43**(4), 761-770
- Pakula R., Melchior A., Denys A., Vanpouille C., Mazurier J. and Allain F. (2007) Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* **17**(5), 492-503
- Pålsson-McDermott E.M. & O'Neill L.A. (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113**(2), 153-162
- Pap T. (2005) Cyclophilins in rheumatoid arthritis-stepping into an undiscovered country. *Clin. Immunol.* **116**(3), 199-201
- 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**(22), 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**(3-4) 219-221
- Pellegrini M., Pilia G., Pantano S., Lucchini F., Uda M., Fumi M., Cao A., Schlessinger D. and Forabosco A. (1998) Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Dev. Dyn.* **213**(4), 431-439
- 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**(1-2), 83-89
- 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**(15), 4552-4558
- Pilette C., Ouadrhiri Y., Van Snick J., Renaud J.C., Staquet P., Vaerman J.P. and Sibille Y. (2002) IL-9 inhibits oxidative burst and TNF-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes through TGF-beta. *J. Immunol.* **168**(8), 4103-4111
- Pilia G., Hughes-Benzie R.M., MacKenzie A., Baybayan P., Chen E.Y., Huber R., Neri G., Cao A., Forabosco A. and Schlessinger D. (1996) Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat. Genet.* **12**(3), 241-247
- Povlsen J.V., Rasmussen A., Madsen M. and Lamm L.U. (1990) Cyclosporin-induced immunosuppression in vitro. II. Variation in sensitivity and binding capacity. *Scand. J. Immunol.* **32**(1), 45-51
- Pradervand S., Maurya M.R. and Subramaniam S. (2006) Identification of signaling components required for the prediction of cytokine release in RAW 264.7 macrophages. *Genome Biol.* **7**(2), R11
- Prager G.W., Feral C.C., Kim C., Han J. and Ginsberg M.H. (2007) CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin beta subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling. *J. Biol. Chem.* **282**(33), 24477-24484
- 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**(5), 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**(9), 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**(4), 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**(11), 6360-6365

- Pushkarsky T., Yurchenko V., Vanpouille C., Brichacek B., Vaisman I., Hatakeyama S., Nakayama K.I., Sherry B. and Bukrinsky M. (2005) Cell surface expression of CD147/EMMPRIN/ is regulated by cyclophilin 60. *J. Biol. Chem.* **280**(30), 27866-27871
- Qiao D., Meyer K., Mundhenke C., Drew S.A. and Friedl A. (2003) Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 signaling in brain endothelial cells. Specific role for glypican-1 in glioma angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**(18), 16045-16053
- Qureshi S.T., Lariviere L., Leveque G., Clermont S., Moore K.J., Gros P. and Malo D. (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* **189**(4), 615-625
- Rabenstein D.L. (2002) Heparin and heparan sulfate : structure and function. *Nat. Prod. Rep.* **19**(3), 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**(2), 180-184
- Rahfeld J.U., Rucknagel K.P., Stoller G., Horne S.M., Schierhorn A., Young K.D. and Fischer 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**(36), 22130-22138
- 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**(18), 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**(6), 2961-2965
- Reiss M. & Barcellos-Hoff M.H. (1997) Transforming growth factor-beta in breast cancer : A working hypothesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **45**(1), 81-95
- Reizes O., Goldberger O., Smith A.C., Xu Z., Bernfield M. and Bickel P.E. (2006) Insulin promotes shedding of the syndecan ectodomains from 3T3-L1 adipocytes: a proposed mechanism for stabilization of extracellular lipoprotein lipase. *Biochemistry* **45**(18), 5703-5711
- Renno T., Wilson A., Dunkel C., Coste I., Maisnier-Patin K., Benoit de Coignac A., Aubry J-P., Lees R.K., Bonnefoy J-Y., MacDonald H.R. and Gauchat J-F. (2002) A role for CD147 in thymic development. *J. Immunol.* **168**(10), 4946-4950
- 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**(4), 642-647
- 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**(34), 25926-25930
- Rintoul R.C., BATTERY R.C., Mackinnon A.C., Wong W.S., Mosher D., Haslett C. and Sethi T. (2002) Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth. *Mol. Biol Cell* **13**(8), 2841-2852
- Risau W., Hallmann R., Albrecht U. and Henke-Fahle S. (1986) Brain induces the expression of an early cell surface marker for blood-brain barrier-specific endothelium. *EMBO J.* **5**(12), 3179-3183
- Robinson C.J, Mulloy B., Gallagher J.T. and Stringer S.E. (2006) VEGF165-binding sites within heparan sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase. *J. Biol. Chem.* **281**(3), 1731-1740
- Roscic-Mrkic B., Fischer M., Leemann C., Manrique A., Gordon C.J., Moore J.P., Proudfoot A.E. and Trkola A. (2003) RANTES (CCL5) uses the proteoglycan CD44 as an auxiliary receptor to mediate cellular activation signals and HIV-1 enhancement. *Chemokines* **102**(4), 1169-1177
- 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**(8), 1763-1772
- Ruchalski K., Mao H., Singh S.K., wang Y., Mosser D.D., Li F., Schwartz J.H. and Borkan S.C. (2003) HSP72 inhibits apoptosis-inducing factor release in ATP-depleted renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**(6), C1483-1493
- Rusnak F. & Mertz P. (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* **80**(4), 1483-1521
- 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**(8), 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**(10), 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**(3), 399-404
- Ryffel B. (1993) Cyclosporin binding proteins. Identification, distribution, function and relation to FK binding proteins. *Biochem. Pharmacol.* **46**(1), 1-12
- Salojin K.V., Owusu I.B., Millerchip K.A., Potter M., Platt K.A. and Oravec T. (2006) Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses. *J. Immunol.* **176**(3) 1899-1907
- Sameshima T., Nabeshima K., Toole B.P., Inoue T., Yokogami K., Nakano S., Ohi T. and Wakisaka S. (2003) Correlation of emmprin expression in vascular endothelial cells with blood-brain-barrier function: a study using magnetic resonance imaging enhanced by Gd-DTPA and immunohistochemistry in brain tumors. *Virchows Arch.* **442**(6), 577-584
- Sanchez-Tillo E., Wojciechowska M., Comalada M., Farrera C., Lloberas J. and Celada A. (2006) Cyclophilin A is required for M-CSF-dependent macrophage proliferation. *Eur. J. Immunol.* **36**(9), 2515-2524
- 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**(4), 435-440
- Sanderson R.D. and Borset M. (2002) Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Ann. Hematol.* **81**(3), 125-135
- Sanglier J.-J., Quesniaux V., Fehr T., Hofmann H., Mahnke M., Memmert K., Schuler W., Zenke G., Gschwind L., Maurer C. and Schilling W. (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**(5), 466-473
- Saoncella S., Echtermeyer F., Denhez F., Nowlen J.K., Mosher D.F., Robinson S.D., Hynes R.O. and Goetinck P.F. (1999) Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**(6), 2805-2810
- Saoncella S., Calautti E., Neveu W. and Goetinck P.F. (2004) Syndecan-4 regulates ATF-2 transcriptional activity in a Rac1-dependant manner. *J. Biol. Chem.* **279**(45), 41172-41176
- 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**(23), 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**(19), 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), 2255-2262
- Sarrazin S., Bonnaffé D., Lubineau A. and Lortat-Jacob H. (2005) A synthetic glycoconjugate that recognizes the heparin binding domain of interferon- $\gamma$  inhibits the cytokine activity. *J. Biol. Chem.* **280**(45), 37558-37564
- 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**(5), 904-910

- 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**(1), 78-93
- Schlosshauer B. and Herzog K.H. (1990) Neurothelin: an inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons. *J. Cell. Biol.* **110**(4), 1261-1274
- 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**(27), 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**(14), 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**(1), 69-73
- Schreiber S.L. (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* **251**, 283-287
- Schumann R.R., Leong S.R., Flagg G.W., Gray P.W., Wright S.D., Mathison J.C., Tobias P.S. and Ulevitch R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**(4975), 1429-1431
- Screaton G.R., Bell M.V., Jackson D.G., Cornelis F.B., Gerth U. and Bell J.I. (1992) Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**(24), 12160-12164
- 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) Sanglifohrin-cyclophilin interaction : degradation work, synthetic macrocyclic analogues, X-ray crystal structure, and binding data. *J. Am. Chem. Soc.* **125**(13), 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
- Seko Y., Fujimura T., Taka H., Mineki R., Murayama K. and Nagai R. (2004) Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**(1), 162-168
- Seulberger H., Lottspeich F. and Risau W., (1990) The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein. *EMBO J.* **9**(7), 2151-2158
- Sharifi N., Hurt E.M., Kawasaki B.T. and Farrar W.L. (2007) TGFBR3 loss and consequences in prostate cancer. *Prostate.* **67**(3), 301-311
- Shepherd E.G., Zhao Q., Welty S.E., Hansen T.N., Smith C.V. and Liu Y. (2004) The function of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in peptidoglycan-stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**(52), 54023-54031
- 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**(4), 1758-1763
- Shi Y.F., Sahai B.M. and Green D.R. (1989) Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* **339**(6226), 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**(6210), 67-70
- Shin J., Lee W., Lee D., Koo B.K., Han I., Lim Y., Woods A., Couchman J.R. and Oh E.S. (2001) Solution structure of the dimeric cytoplasmic domain of syndecan-4. *Biochemistry* **40**(29), 8471-8478

- Shiraishi S., Yokoo H., Kobayashi H., Yanagita T., Uezono Y., Minami S., Takasaki M. and Wada A. (2000) Post-translational reduction of cell surface expression of insulin receptors by cyclosporin A, FK506 and rapamycin in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* **293**(3), 211-215
- 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**(12), 1582-1587
- Shukla D., Liu J., Blaiklock 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**(1), 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**(44), 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**(8), 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**(Pt 3), 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**(6244), 755-757
- Sigal N.H., Dumont F., Durette P., Siekierka J.J., Peterson L., Rich D.H., Dunlap B.E., Staruch M.J., Melino M.R., Koprak S.L., Williams D., Witzel B. and Pisano J.M. (1991) Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A. *J. Exp. Med.* **173**(3), 619-628
- Sigal N.H. and Dumont F.J. (1992) Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: pharmacological probes of lymphocyte signal transduction. *Ann. Rev. Immunol.* **10**, 519-560
- 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* pp 1-31
- Simons K. & Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 31-39
- 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**(31), 18323-18328
- Song H.H. & Filmus J. (2002) The role of glypicans in mammalian development. *Biochim. Biophys. Acta.* **1573**(3), 241-246
- Song S.J., Cool S.M. and Nurcombe V. (2007) Regulated expression of syndecan-4 in rat calvaria osteoblasts induced by fibroblast growth factor-2. *J. Cell. Biochem.* **100**(2), 402-411
- 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**(17), 10735-10738
- Spillmann D., Witt D. and Lindahl U. (1998) Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **273**(25), 15487-15493
- Spillmann D. (2001) Heparan sulfate : anchor for viral intruders ? *Biochimie* **83**(8), 811-817
- Staffler G., Szekeres A., Schutz G.J., Säemann M.D., Prager E., Zeyda M., Drbal K., Zlabinger G.J., Stulnig T.M. and Stockinger H. (2003) Selective inhibition of T cell activation via CD147 through novel modulation of lipid rafts. *J. Immunol.* **171**(4), 1707-1714
- Stanley M.J., Liebersbach B.F., Liu W., Anhalt D.J. and Sanderson R.D. (1995) Heparan sulfate-mediated cell aggregation. Syndecans-1 and -4 mediate intercellular adhesion following their transfection into human B lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* **270**(10), 5077-5083

- Steinfeld R., Van Den Berghe H. and David G. (1996) Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J. Cell. Biol.*, **133**(2), 405-416
- Steinmann B., Bruckner P. and Superti-Furga A. (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase. *J. Biol. Chem.* **266**(2), 1299-1303
- Steinschulte C., Taner T., Thomson A.W., Bein G. and Hackstein H. (2003) Cutting edge: sangliferrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells. *J Immunol.* **171**(2), 542-546
- Stemmer P.M., Wang X., Krinks M.H. and Klee C.B. (1995) Factors responsible for the Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of calcineurin in brain. *FEBS Lett.* **374**(2), 237-240
- Stenvers K.L., Tursky M.L., Harder K.W., Kountouri N., Amatayakul-Chantler S., Grail D., Small C., Weinberg R.A., Sizeland A.M. and Zhu H.J. (2002) Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol. Cell Biol.*, **23**(12), 4371-4385
- Stockinger H., Ebel T., Hansmann C., Koch C., Majdic O., Prager E., Patel D.D., Fox D.A., Hrejsi V., Sagawa K. and Shen D-C., (1997) CD147 (neurothelin/basigin). Workshop Panel report. In: Kishimoto T., Kikutani H., Borne A.E.G. *et al.*, eds. *Leucocyte Typing VI*. New York; Garland Publishing, Inc., 760-766
- 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**(20), 4939-4948
- Stonehouse T.J., Woodhead V.E., Herridge P.S., Ashrafian H., George M., Chain B.M. and Katz D.R. (1999) Molecular characterization of U937-dependent T-cell co-stimulation. *Immunobiology* **96**(1), 35-47
- Stütz A. (1992) Immunosuppressive macrolides. *Transplant. Proc.* **24**(4 suppl 2), 22-25
- Su G., Meyer K., Nandini C.D., Qiao D., Salamat S. and Friedl A. (2006) Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells. *Am. J. Pathol.* **168**(6), 2014-2026
- Subramanian S.V., Fitzgerald M.L. and Bernfield M. (1997) Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomain by thrombin and growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* **272**(23), 14713-14720
- Sullivan P.G., Thompson M.B. and Scheff S.W. (1999) Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* **160**(1), 226-234
- Sun J. and Hemler M.E. (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res.* **61**(5), 2276-2281
- Sung Y.K., Hwang S.Y., Park M.K., Farooq M., Han I.S., Bae H.I., Kim J.C. and Kim M. (2003) Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* **94**(3), 259-262
- Suzuki J., Jin Z.G., Meoli D.F., Matoba T. and Berk B.C. (2006) Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **98**(6), 811-817
- 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**(9), 3741-3745
- Swantek J.L., Cobb M.H. and Geppert T.D. (1997) Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell Biol.* **17**(11), 6274-6282
- 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**(1-2), 83-89
- Tajima M., Higuchi S., Higuchi Y., Miyamoto N., Uchida A., Ito M., Nishio M., Komada H., Kawano M., Kusagawa S., Tsurudome M. and Ito Y. (1999) Suppression of FRP-1/CD98-mediated multinucleated giant cell and osteoclast formation by an anti-FRP-1/CD98 mAb, HBJ 127, that inhibits c-src expression. *Cell Immunol.* **193**(2), 162-169



- Tak P.P., Taylor P.C., Breedveld F.C., Smeets T.J., Daha M.R., Kluin P.M., Meinders A.E. and Maini R.N. (1999) Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **39**(7), 1077-1081
- Takahashi N., Hayano T. and Suzuki M. (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**(6206), 473-475
- Tang W., Chang S.B. and Hemler M.E. (2004) Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol. Biol. Cell* **15**(9), 4043-4050
- Tang W. and Hemler M.E. (2004) Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J. Biol. Chem.* **279**(12), 11112-11118
- 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 Ca<sup>2+</sup> and oxidant stress. *Eur. J. Biochem.* **238**(1), 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**(2), 968-976
- Taylor P.M., Woodfield R.J., Hodgkin M.N., Pettitt T.R., Martin A., Kerr D.J. and Wakelam M.J. (2002) Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway. *Oncogene* **21**(37), 5765-5772
- 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**(5), 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**(6504), 363-365
- Thorne R.F., Legg J.W. and Isacke C.M. (2004) The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J. Cell Sci.* **117**(Pt 3), 373-380
- Tiwari V., O'Donnell C.D., Oh M.J., Valyi-Nagy T. and Shukla D. (2005) A role for 3-O-sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**(2), 930-937
- Tkachenko E. and Simons M. (2002) Clustering induces redistribution of syndecan-4 core protein into raft membrane domains. *J. Biol. Chem.* **277**(22), 19946-19951
- Tkachenko E., Rhodes J.M. and Simons M. (2005) Syndecans new kids on the signalling block. *Circ. Res.* **96**(5), 488-500
- 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**(2), 718-726
- Tomita T., Nakase T., Kaneko M., Shi K., Takahi K., Ochi T. and Yoshikawa H. (2002) Expression of extracellular matrix inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**(2), 373-378.
- Toole B.P. (2003) EMMPRIN (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinases production and function. *Curr. Top Dev. Biol.* **54**, 371-389
- 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**(6), 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**(11), 3796-3802
- 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.* **263**(28), 14433-14440
- 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**(3), 269-288

- Turley R.S., Finger E.C., Hempel N., How T., Fields T.A. and Blobel G.C. (2007) The type III transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer Res.* **67**(3), 1090-1098
- Turnbull J., Powell A. and Guimond S. (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol.* **11**(2), 75-82
- Ueda Y., Hirai S., Osada S., Suzuki A., Mizuno K. and Ohno S. (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J. Biol. Chem.* **271**(38), 23512-23519
- 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**(31), 29134-29140
- Vajdos F.F., Yoo S., Houseweart M., Sundquist W.I. and Hill C.P. (1997) Crystal structure of cyclophilin A complexed with a binding site peptide from the HIV-1 capsid protein. *Protein Sci.* **6**(11), 2297-2307
- 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**(22), 5494-505
- 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**(10), 6499-6506
- 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**(1), 105-124
- Vanpouille C, Denys A, Carpentier M, Pakula R, Mazurier J, and Allain F (2004) Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of cyclophilin B to heparin and heparan sulfates. *Biochemical J.* **382**(Pt 2):733-740
- Vanpouille C, Deligny A, Delehedde M, Denys A, Melchior A, Lienard X, Lyon M, Mazurier J, Fernig DG, Allain F. (2007) The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-O-sulfated N-unsubstituted glucosamine residue. *J. Biol. Chem.* **282**(33), 24416-24429
- Vives R.R., Sadir R., Imberty A., Rencurosi A., Lortat-Jacob H. (2002) A kinetics and modeling study of RANTES (9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerization. *Biochemistry.* **41**(50), 14779-14789
- 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**(34), 24417-24424
- 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**(Pt 1), 313-319
- Wang T. and Donahoe P.K. (2004) The immunophilin FKBP12: a molecular guardian of the TGF-beta family type I receptors. *Front Biosci.* **1**, 619-361
- Wang P. and Heitman J. (2005) The cyclophilins. *Genome Biology* **6**(7), 226
- Wang L., Wu G., Yu L., Yuan J., Fang F., Zhai Z., Wang F. and Wang H. (2006) Inhibition of CD147 expression reduces tumor cell invasion in human prostate cancer cell line via RNA interference. *Cancer Biol. Ther.* **5**(6), 608-614
- Wang X. and Liu Y. (2007) Regulation of the innate response by MAP kinase phosphatase-1. *Cell. Signal.* **19**(7), 1372-1382
- Warren A.P., Patel K., Miyamoto Y., Wygant J.N., Woodside D.G. and McIntyre B.W. (2000) Convergence between CD98 and integrin-mediated T-lymphocyte co-stimulation. *Immunology* **99**(1), 62-68
- 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**(5), 1207-1218

- Watashi K., Hijikata M., Hosaka M., Yamaji M. and Shimotohno K. (2003) Cyclosporin A suppresses replication of the hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* **38**(5), 1282-1288
- Watashi K., Ishii N., Hijikata M., Inoue D., Murata T., Miyanari Y. and Shimotohno K. (2005) Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* **19**(1), 111-122
- Westling C. and Lindahl U. (2002) Location of N-substituted residues in heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **277**(51), 49247-49255
- Whitelock J.M. and Iozzo R.V. (2005) Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity. *Chem. Rev.*, **105**(7), 2745-2764
- 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**(1), 261-274
- Wielanga V.J.M., van der Voort R., Taher T.E.I., Smit L., Beuling E.A., van Krimpen C., Spaargaren M. and Pals S.T. (2000) Expression of c-Met and heparan sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* **157**(5), 1563-1573
- Wilcox-Adelman S.A., Denhez F. and Goetinck P.F. (2002) Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**(36), 32970-32977
- Wilke M.S. and 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**(3), 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**(1), 101-104
- Wilson M.C., Meredith D., and Halestrap A.P. (2002) Fluorescence resonance energy transfer studies on the interaction between the lactate transporter MCT-1 and CD147 provide information on the topology and stoichiometry of the complex in situ. *J. Biol. Chem.* **277**(5), 3666-3672.
- 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**(2), 439-446
- Woodfield K.Y., Price N.T. and Halestrap A.P. (1997) cDNA cloning of rat mitochondrial cyclophilin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1351**(1-2), 27-30
- Woodhead V.E., Stonehouse T.J., Binks M.H., Speidel K., Fox D.A., Gaya A., Hardie D., Henniker A.J., Horejsi V., Sagawa K., Skubitz K.M., Taskov H., Todd R.F., van Agthoven A., Katz D.R. and Chain B.M. (2000) Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation. *Int. Immunol.* **12**(7), 1051-1061
- Woods A. & Couchman J.R. (1994) Syndecan-4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol. Biol. Cell* **5**(2), 183-192
- Woods A & Couchman J.R (1998) Syndecans : synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol.* **8**(5), 189-192
- 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**(40), 37912-37919
- Xiang Y.Y., Ladedo V., Filmus J. (2000) Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. *Oncogene* **20**(50), 7408-7412
- Xiao Y.Q., Malcolm K., Worthen G.S., Gardai S., Schiemann W.P., Fadok V.A., Bratton D.L. and Henson P.M. (2002) Cross-talk between RK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.* **277**(17), 14884-14893
- 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**(17), 11968-11971
- Xu D. and Hemler M.E. (2005) Metabolic activation-related CD147-CD98 complex. *Mol. Cell Proteomics.* **4**(8), 1061-1071

- Xu D., Tiwari V., Xia G., Clement C., Shukla D. and Liu J. (2005) Characterisation of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem J.* **385**(Pt 2), 451-459
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K. and Akira S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**(5633), 640-643
- 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**(4), 506-511
- Yoneda A. and Couchman J.R. (2003) Regulation of the cytoskeletal organization by syndecans transmembrane proteoglycans. *Matrix Biol.* **22**(1), 25-33
- Yoo J., Jeong M.J., Cho H.J., Oh E.S. and Han M.Y. (2005) Dynamin II interacts with syndecan-4, a regulator of focal adhesion and stress fiber formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**(2), 424-431
- Yoshida S., Shibata M., Yamamoto S., Hagihara M., Asai N., Takahashi M., Mizutani S., Muramatsu T., and Kadomatsu K. (2000) Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. *Eur. J. Biochem.* **267**(14), 4372-4380
- Yu Q. and Stamenkovic I. (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* **13**(1), 35-48
- 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**(4), 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**(25), 22959-22965
- Yurchenko V., Pushkarsky T., Li J.H., Dai W.W., Sherry B. and Bukrinsky M. (2005) Regulation of CD147 cell surface expression. *J. Biol. Chem.* **280**(17), 17013-17019
- Yurchenko V., Constant S. and Bukrinsky M. (2006) Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology* **117**(3), 301-309
- 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**(Pt 1), 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) Sangliferin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action. *J. Immunol.* **166**(12), 7165-7171
- Zent R., Fenczik C.A., Calderwood D.A., Liu S., Dellos M. and Ginsberg M.H. (2000) Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin beta cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* **275**(7), 5059-5064
- Zhang L., David G. and Esko J.D. (1995) Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan sulfate assembly in proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **270**(45), 27127-27135
- Zhang L-H. and Liu J.O. (2001) Sangliferin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle. *J. Immunol.* **166**(9), 5611-5618
- Zhang L-H., Youn H-D. and Liu J.O. (2001) Inhibition of cell cycle progression by the novel cyclophilin ligand sangliferin A is mediated through the NFkappa B-dependent activation of p53. *J. Biol. Chem.* **276**(47), 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**(12), 6332-6343
- Zhao Q., Shepherd E.G., Manson M.E., Nelin L.D. and Sorokin A. (2005) The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **280**(9), 8101-8108

- Zhou S., Zhou H., Walian P.J. and Jap B.K. (2005) CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**(21), 7499-7504
- Zhou S., Zhou H., Walian P.J. and Jap B.K. (2007) Regulation of gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *Biochemistry*. **46**(10), 2553-2563
- Zhu P., Ding J., Zhou J., Dong W-J., Fan C-M., and Chen Z-N. (2005) Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis : its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production. *Arthritis Res. Ther.* **7**(5), R1023-1033
- Zhu P., Lu N., Shi Z-G., Zhou J., Wu Z-B., Yang Y., Ding J., and Chen Z-N. (2006). CD147 overexpression on synoviocytes in rheumatoid arthritis enhances metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes., *Arthritis Res. Ther.* **8**(2), R44
- Zimmermann P. and David G. (1999) The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J.*, **13**, suppl S91-S100
- Zimmermann P., Tomatis D., Rosas M., Grootjans J., Leenaerts I., Degeest G., Reekmans G., Coomans C. and David G. (2001) Characterisation of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments. *Mol. Biol. Cell* **12**(2), 339-350
- Zimmermann P., Zhang Z., Degeest G., Mortier E., Leenaerts I., Coomans C., Schulz J. N'kuli F., Courtoy P.J. and David G. (2005) Syndecan recycling is controlled by syntenin-PIP<sub>2</sub> interactions and Arf6. *Dev. Cell* **9**(3), 377-388
- Zou W., Yang H., Hou X., Zhang W., Chen B. and Xin X. (2007) Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells. *Cancer Lett.* **248**(2), 211-218
- Zucker S., Hymowitz M., Rollo E.E., Mann R., Conner C.E. Cao J., Foda H.D., Tompkins D.C. and Toole B.P. (2001) Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRN). *Am. J. Pathol.* **158**(6), 1921-1928
- Zydowsky L.D., Etzkorn F.A., Chang H.Y., Ferguson S.B., Stolz L.A., Ho S. and Walsh C.T. (1992) Active sites mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition. *Protein Sci.* **1**(9), 1092-1099

Annexe

---

# The Heparin/Heparan Sulfate Sequence That Interacts with Cyclophilin B Contains a 3-O-Sulfated N-Unsubstituted Glucosamine Residue\*

Received for publication, March 2, 2007, and in revised form, June 12, 2007. Published, JBC Papers in Press, June 22, 2007, DOI 10.1074/jbc.M701835200

Christophe Vanpouille<sup>‡1</sup>, Audrey Deligny<sup>‡</sup>, Maryse Delehedde<sup>§2</sup>, Agnès Denys<sup>‡</sup>, Aurélie Melchior<sup>‡</sup>, Xavier Liénard<sup>‡</sup>, Malcolm Lyon<sup>¶</sup>, Joël Mazurier<sup>‡</sup>, David G. Fernig<sup>§</sup>, and Fabrice Allain<sup>‡3</sup>

From the <sup>‡</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche Number 8576 du CNRS, Institut de Recherche Fédératif No. 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France, the <sup>§</sup>School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, United Kingdom, and the <sup>¶</sup>Department of Medical Oncology, University of Manchester, Christie Hospital, Manchester M20 4BX, United Kingdom

Many of the biological functions of heparan sulfate (HS) proteoglycans can be attributed to specialized structures within HS moieties, which are thought to modulate binding and function of various effector proteins. Cyclophilin B (CyPB), which was initially identified as a cyclosporin A-binding protein, triggers migration and integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes by a mechanism dependent on interaction with cell surface HS. Here we determined the structural features of HS that are responsible for the specific binding of CyPB. In addition to the involvement of 2-O-, 6-O-, and N-sulfate groups, we also demonstrated that binding of CyPB was dependent on the presence of N-unsubstituted glucosamine residues (GlcNH<sub>2</sub>), which have been reported to be precursors for sulfation by 3-O-sulfotransferases-3 (3-OST-3). Interestingly, 3-OST-3B isoform was found to be the main 3-OST isoenzyme expressed in peripheral blood T lymphocytes and Jurkat T cells. Moreover, down-regulation of the expression of 3-OST-3 by RNA interference potently reduced CyPB binding and consequent activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases. Altogether, our results strongly support the hypothesis that 3-O-sulfation of GlcNH<sub>2</sub> residues could be a key modification that provides specialized HS structures for CyPB binding to responsive cells. Given that 3-O-sulfation of GlcNH<sub>2</sub>-containing HS by 3-OST-3 also provides binding sites for glycoprotein gD of herpes simplex virus type I, these findings suggest an intriguing structural linkage between the HS sequences involved in CyPB binding and viral infection.

Heparan sulfate (HS)<sup>4</sup> proteoglycans on the cell surface or in the extracellular matrix are involved in developmental, regen-

eratory, and inflammatory processes, as a consequence of their interactions with multiple proteins. These interactions are mediated mainly via the HS moieties of the proteoglycans, which bind to growth factors, cytokines, matrix components, enzymes, and enzyme inhibitors and thereby regulate tissue distribution, biological availability, and activity of the proteins. Characterization of heparin/HS oligosaccharides with high affinity to proteins such as antithrombin and growth factors has led to the identification of specialized protein binding domains with structural features exhibiting varying degrees of specificity (1–3). The structural distinctions in these functional heparin/HS domains are derived from enzymatic modifications in the Golgi apparatus of the nascent polymer composed of alternating D-glucuronic acid (GlcUA) and N-acetylated D-glucosamine (GlcNAc) units. The nonsulfated precursor is first subject to partial N-deacetylation/N-sulfation of GlcNAc residues, which leads to the occurrence of consecutively N-sulfated regions, regions that escape modification and remains N-acetylated, and regions of alternating N-acetylated and N-sulfated disaccharide units. Sometimes, the N-deacetylation/N-sulfation reaction is partial, giving rise to N-unsubstituted glucosamine units (GlcNH<sub>2</sub>). The further modification reactions include C<sub>5</sub> epimerization of some GlcUA into L-iduronic acid (IdoUA), 2-O-sulfation of IdoUA, and 6-O-sulfation of GlcN units. Rarely, O-sulfation also occurs at position 2 of GlcUA and at position 3 of N-sulfated GlcN (GlcNS) and of GlcNH<sub>2</sub> units, the latter modifications are hallmarks for the respective binding HS domains of antithrombin and glycoprotein gD of herpes simplex virus type I (HSV-1). These modifications are regulated by HS biosynthetic enzymes, including N-deacetylases/N-sulfotransferases, 2-O-sulfotransferase (2-OST), 3-O-sulfotransferases (3-OST), 6-O-sulfotransferases (6-OST), and C<sub>5</sub>-epimerase. Importantly, spatially and temporary coordinated modifications of nascent HS precursor by these enzymes are

\*This work was supported by the CNRS, the Université des Sciences et Technologies de Lille, France, the Cancer and Polio Research Fund, and the North West Cancer Research Fund, UK. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> Present address: Laboratory of Molecular and Cellular Biophysics, NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

<sup>2</sup> Present address: ENDOTIS Pharma, Parc Eurasanté, 59120 Loos, France.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-20-33-72-39; Fax: 33-3-20-43-65-55; E-mail: fabrice.allain@univ-lille1.fr.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: HS, heparan sulfate; ANTS, 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid; CyPB, cyclophilin B; dp, degree of polymeriza-

tion; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FGF-2, fibroblast growth factor-2; ΔFMV, variation of fluorescence mean value; GFP, green fluorescent protein; GlcN, D-glucosamine, GlcNAc, N-acetylated D-glucosamine; GlcNH<sub>2</sub>, N-unsubstituted D-glucosamine; GlcNS, N-sulfated D-glucosamine; GlcUA, D-glucuronic acid; HGF, hepatocyte growth factor; HSV-1, herpes simplex virus type I; IdoUA, L-iduronic acid; MAPK, mitogen-activated protein kinase; OST, O-sulfotransferase; siRNA, small-interfering RNA; BSA, bovine serum albumin; HGF, hepatocyte growth factor.

thought to control the activities of HS-binding proteins, presumably through the interactions with structurally distinct HS species from different cell types and tissue loci (3, 4). In support of this idea, immunohistochemical studies of tissues with antibodies to HS epitopes have demonstrated differences within HS in distinct cellular environments (5). Structural characterization of the binding heparin/HS domain of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) has illustrated the importance of contiguous stretches of the disulfated disaccharide IdoUA2S-GlcNS  $\pm$  6S for efficient interaction. Surprisingly, experimental data have demonstrated that 6-O-sulfation of GlcNS, although not directly involved in the binding of the protein to heparin/HS, is an absolute requirement for proliferative activity of FGF-2 (6, 7). Therefore, the structural heterogeneity of HS could explain the remarkable tissue-specific activities of FGF-2, with regard to the ability of HS to form active complexes with the protein and its cognate signaling receptor on responsive cells (8). Another example of binding heparin/HS domain specifically involved in protein interaction is the well defined pentasaccharide required for the binding and activity of antithrombin-III. The most distinguishing feature of this motif is the unusual 3-O-sulfated GlcNS unit, which is essential for high affinity binding of antithrombin and anti-coagulant activity (9, 10).

With regard to the ability of HS domains to form active complexes with extracellular soluble mediators, it could be hypothesized that many of the regulatory functions attributed to proteoglycans may actually be related to the interactions with cell-specific HS species. A class of recently identified inflammatory mediators is secreted cyclophilins (11–14), which are mostly known as cyclosporin A-binding proteins (15, 16). We demonstrated that cyclophilin B (CyPB) triggers chemotaxis and integrin-mediated adhesion of T lymphocytes mainly of the CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> phenotype (11). These activities are dependent on the interactions with two types of binding sites, CD147 and cell surface HS. By using site-directed mutated ligands, we demonstrated that the peptides <sup>3</sup>KKK<sup>5</sup> and <sup>14</sup>YFD<sup>16</sup>, which are located in the N-terminal extension of CyPB, are required for efficient binding of CyPB to heparin and cell surface HS expressed on T cells (17). CyPB<sub>KKK</sub>, for which the sequence <sup>3</sup>KKK<sup>5</sup> was replaced by AAA, and CyPB<sub>ΔYFD</sub>, which corresponds to the protein depleted of the sequence <sup>14</sup>YFD<sup>16</sup>, were both deficient in their capability to induce cell adhesion to fibronectin (18). Most recently, we found that octasaccharides are the minimal length unit required for efficient binding of CyPB to heparin and cell surface HS of T lymphocytes. Molecular modeling confirmed that <sup>3</sup>KKK<sup>5</sup> and <sup>14</sup>YFD<sup>16</sup> tripeptides were spatially arranged in the three-dimensional structure of the protein, so that they may act synergistically to form a binding site for an octasaccharide (19). Therefore, an intriguing possibility is that the pro-migratory activity of CyPB may be dependent on interaction with specific binding HS domain present at the cell surface of responsive T cells.

The focus of this study was to characterize structural features within cell surface HS, which could explain the specific interaction with CyPB. Heparin is structurally related to the sulfated regions of HS, and we demonstrated that heparin and cell surface HS of T lymphocytes share the same capability to interact with CyPB (20). Therefore, heparin and chemically modified

derivatives were used to determine the structural features within HS for optimal CyPB binding. In addition to the requirement of *N*- and *O*-sulfate groups, which is a common feature for binding of numerous heparin-binding proteins, we demonstrated that interaction of CyPB with heparin/HS was strictly dependent on the presence of GlcNH<sub>2</sub> residues. 3-OST are represented by seven distinct isoenzymes that are expressed at distinct levels in various human tissues, suggesting their involvement in making tissue-specific HS with different biological functions (9, 21, 22). Interestingly, certain isoforms of 3-OST have been reported to sulfate GlcNH<sub>2</sub>-containing disaccharides within HS (23, 24). Therefore, we explored the relationships between the expression of multiple 3-OST isoforms and the responses triggered by CyPB binding to T cells. Our results suggest an intriguing implication of the GlcNH<sub>2</sub> residue and 3-O-sulfation by 3-OST3B isoform in efficient binding of CyPB to responsive T cells.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials and Cells**—Human recombinant CyPB and FGF-2 were produced and purified as described (25, 26). Hepatocyte growth factor (HGF) was from R & D Systems (Abingdon, UK). Heparin-derived octasaccharides were prepared from partial heparinase I (EC 4.2.2.7) digests of pig mucosal heparin (Sigma), as described (19), the main disaccharide unit (>75%) being IdoUA2S-GlcNS6S. Biotinylated bovine serum albumin (BSA) conjugated to heparin via its reducing end was purchased from Sigma. *N*-Desulfated, *N*-desulfated *N*-reacetylated, and *N*-acetylated heparin derivatives were produced as described (27). 2-*O*-Desulfated and 6-*O*-desulfated heparins were a generous gift from B. Mulloy (National Institute for Biological Standards and Control, Herts, UK). Cell surface HS were purified from peripheral blood T lymphocytes as described (19). Briefly, cell surface proteoglycans were purified by anion exchange chromatography on DEAE-Sepharose (Amersham Biosciences) and treated by enzymatic digestion of anionic contaminants by sequential treatments with chondroitinase ABC (EC 4.2.2.4), DNase I (EC 3.1.21.1), and neuraminidase (EC 3.2.1.18) (all enzymes from Sigma). Glycopeptides were then obtained by digestion with Pronase E (EC 3.4.24.4) (Sigma) overnight at 37 °C and subjected to nonreductive  $\beta$ -elimination. The liberated glycosylamines were converted in reducing oligosaccharides through the addition of boric acid and freeze-dried before use. Reagents for electrophoresis were from Bio-Rad. The pan-extracellular signal-regulated kinase (ERK) antibodies, which recognize p44/42 mitogen-activated protein kinases (MAPK) regardless of their phosphorylation status, and the antibodies to phosphorylated forms of p44/42 MAPK were purchased from Sigma and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), respectively. Secondary peroxidase-labeled anti-IgG antibodies were from Amersham Biosciences. All other chemicals, except where otherwise mentioned, were purchased from Sigma.

Human citrated venous blood samples were obtained from the local blood transfusion center (Etablissement de Transfusion Sanguine, Lille, France). Isolation of peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was conducted by exhaustive negative selection as described (11, 28). The purity of the CD4<sup>+</sup> T cell



## Involvement of GlcNH<sub>2</sub>3S in CyPB Binding to HS

population was assessed by flow cytometry and found to be >95%. Heparinase-treated T lymphocytes were obtained by incubating cells with 0.75 unit of heparinase I/10<sup>6</sup> cells for 2 h at 37 °C (11, 20). Human lymphoblastic Jurkat T cells (clone E6-1, ATCC TIB-152) and promonocytic leukemia THP-1 cells (88081201, ECACC, Porton Down, Salisbury, UK) were routinely cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 10 mM gentamycin, in a 5% CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere at 37 °C. To induce responsiveness to CyPB, THP-1 cells were differentiated for 72 h with 50 nM 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, as described (29). Human epithelial carcinoma HeLa cells (ATCC-CCL2) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing fetal calf serum, L-glutamine, and gentamycin, as above.

**Biotinylation of Heparin and Oligosaccharides**—*N*-Hydroxysuccinimide-LC-biotin (Pierce) was used to biotinylate heparin through internal free amino groups, as described (30). According to the manufacturer (Sigma), biotinylated heparin-BSA contains 50% (w/w) heparin and 3–5 biotin residues per molecule of conjugate. Heparin chains were linked via reductive amination of the terminal reducing sugar to BSA with a heterobifunctional cross-linking reagent, and conjugation of biotin to the albumin moiety was performed via biotinamidocaproic acid (31). To check whether biotinylation did not lead to partial derivatization of free amino groups of heparin, we quantified the amount of biotin residues that are distributed between glycanic and protein moieties of heparin-BSA conjugate, by using 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid. Briefly, biotinylated heparin-BSA conjugate was treated with either 0.75 unit/ml heparinase I or 1% Pronase (w/v) overnight at 37 °C, in order to liberate biotin residues that would be covalently linked to heparin or albumin moieties, respectively. Products of enzymatic digestion were then separated from not degraded material by gel filtration, and the amount of biotin in solution was determined by competition with known amounts of 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid bound to avidin, according to the protocol provided by Pierce. As expected, biotin residues were only recovered in the Pronase-sensitive fraction, indicating that the procedure of biotinylation of heparin-BSA conjugate has only modified primary amino groups of some lysine residues in the albumin moiety. Therefore, this type of chemical linkage would allow access of ligands to the full length of the glycanic polymer and provide heparin biosensor surfaces with high binding capacity. Heparin-derived oligosaccharides were biotinylated at their reducing ends, as described in Ref. 32. Briefly, oligosaccharides and biotin-*X-X*-hydrazide (Calbiochem) were allowed to react for 2 h at room temperature. Unreacted biotin reagent was removed by ion exchange chromatography, and successful biotinylation of oligosaccharides was confirmed by a dot-plot procedure (32).

**Immobilization of Heparin and Oligosaccharides**—Streptavidin was immobilized on planar aminosilane surfaces according to the recommendations of the manufacturer (IASys, Neosensors, Durham, UK) and then allowed to react with biotinylated derivatives. Glycosaminoglycans give a variable and poor response in optical biosensors (32–34). Therefore, the amount of biotinylated molecules immobilized onto the cuvettes was titrated indirectly by measuring the response to a concentration

of HGF above the  $K_d$  value (35, 36). Sufficient amounts of each size of oligosaccharides or heparin were immobilized to yield a response of no more than 100 arc seconds (600 arc seconds corresponds to 1 ng of protein/mm<sup>2</sup> of the cuvette surface) in the presence of 25 nM HGF. The distribution of bound HGF, and by inference immobilized heparin or oligosaccharides on the surface of the biosensor cuvette, was inspected by examination of the resonance scan in the course of the association phase of binding reactions. This allowed showing that at all times HGF was distributed uniformly on the sensor surface and therefore was not aggregated. In addition, controls demonstrated that in phosphate-buffered saline supplemented with 0.2% Tween 20 (PBS-T, phosphate buffered saline/Tween 20), CyPB, FGF-2, or HGF did not bind to aminosilane surface or to a streptavidin surface derivatized with biotin hydrazide (results not shown).

**Optical Biosensor Binding Assays**—A binding assay consisted of adding the ligands at a known concentration in 5  $\mu$ l of PBS-T into a cuvette containing either heparin- or oligosaccharide-derivatized aminosilane surface equilibrated in 45  $\mu$ l of PBS-T. The association reaction was followed over 250 s. The cuvette was then washed three times with 50  $\mu$ l of PBS-T, and the dissociation of bound ligand into the bulk PBS-T was followed over time. The surface was regenerated by washing twice with 50  $\mu$ l of 2 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.2. All biosensor experiments were carried out at least three times on at least two different surfaces. Binding parameters were calculated from the association and dissociation phases of the binding reactions as described previously (30, 32–35). A single binding assay yielded four binding parameters as follows: the initial rate of association, the on-rate constant ( $k_{on}$ ), and the extent of binding, all calculated from the association phase, and the off-rate constant ( $k_{off}$ ), calculated from the dissociation phase. To avoid artificial second phase binding due either to rates of diffusion of soluble ligands approaching or exceeding the rate of association or to steric hindrance at the binding surface,  $k_{on}$  was only determined at low concentrations of ligands, whereas  $k_{off}$  was preferentially measured in separate experiments, using higher concentrations of CyPB and competing heparin (100  $\mu$ g/ml) in the dissociation buffer to avoid any rebinding artifacts (34). The equilibrium constant ( $K_d$ ) was calculated both from the ratio of the dissociation and association rate constants and, independently, from the extent of binding at the equilibrium in order to provide an estimate of the self-consistency of the results. A single binding site model fitted the data at least as well as a two-site binding model in both the competitive binding assays and the kinetic experiments. Therefore, the binding reaction between the ligands and immobilized heparin was deemed to be monophasic, and a single site model was used to calculate all binding parameters using the nonlinear curve fitting FastFit software (Neosensors). In competitive binding assays, an aminosilane cuvette derivatized with biotinylated BSA-heparin was used with a customized program for the IAsys Auto+ instrument (Neosensors). The cuvette was equilibrated at 20 °C in 40  $\mu$ l of PBS-T, and 5  $\mu$ l of the relevant dilutions of chemically modified heparins in PBS-T was added. Once the base line was stable, 5  $\mu$ l of CyPB was added to initiate the association phase. The binding reaction was continued for 5 min. The surface was

washed three times with 50  $\mu$ l of PBS-T and was regenerated with 2 M NaCl. No change was detected in the amount of CyPB bound to immobilized heparin in the absence of competing heparin derivatives at the start and the end of the experiments. The extent of binding was calculated by fitting the association curve to a single site binding model using the nonlinear curve fitting FastFit software.

**Deaminative Cleavage of Heparin/HS with Nitrous Acid**—To affect *N*-unsubstituted or *N*-sulfated GlcN residues, heparin, cell surface HS, and heparin-derived octasaccharides were cleaved with nitrous acid at high pH (pH 4.0) or at low pH (pH 1.5), respectively (37). In both reactions, freshly prepared reagent was added to the dry oligosaccharide sample and incubated for the indicated times at room temperature. Reactions were stopped by the addition of saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution, and the cleavage products were desalted on a Sephadex G-10 column (Amersham Biosciences). To separate CyPB-specific and nonspecific octasaccharides, heparin-derived octasaccharides were incubated with CyPB in 20 mM phosphate, 400 mM NaCl buffer, and the complexes formed by the association of the protein with specific octasaccharides were purified by gel filtration on a Sephadex G-25 column. Following desalting, specifically bound octasaccharides were eluted from the complex by incubation overnight with 1 M NaCl, desalted, and dried under vacuum. In some experiments, octasaccharides were labeled with the fluorescent probe 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS) at the reducing end and then treated with nitrous acid. Fluorescent derivatization was performed by reductive amination as described previously (19). Briefly, dried sample (5–50 nmol) was dissolved in 5  $\mu$ l of acetic acid/water (3:17, v/v) containing 0.2 M ANTS (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) and 5  $\mu$ l of dimethyl sulfoxide containing 1 M sodium cyanoborohydride (Fluka, Buchs, Switzerland). The mixture was incubated at 37 °C for 16 h, desalted on a 10-ml desalting column of Sephadex G-15 column (Amersham Biosciences) equilibrated in water, and thereafter dried under vacuum by using a centrifugal vacuum evaporator. In parallel experiments, octasaccharides were first cleaved by nitrous acid and the degradation products were then derivatized with ANTS. In both cases, the cleavage products were resolved by electrophoresis.

**Carbohydrate Electrophoresis and Mobility Shift Assay**—Heparin, cell surface HS, and products from either deaminative cleavage or heparinase-I digestion (4  $\mu$ g per sample) were incubated in the absence or presence of CyPB (4  $\mu$ g) in 40  $\mu$ l of electrophoresis binding buffer, containing 20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9, for 30 min at room temperature. The samples were then supplemented with 10  $\mu$ l of 60% (v/v) glycerol and subjected to electrophoresis in a 10% (w/v) native polyacrylamide gel in 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4. Electrophoresis was carried at 100 V for 2–3 h at 4 °C, in an SE 600 Standard gel system (18  $\times$  16 cm) (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). The electrophoretic buffer used was 40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0. A mixture of bromphenol blue and phenol red was used as electrophoresis markers. The position of free and CyPB-bound oligosaccharides was then visualized by staining the gel with 0.08% (w/v) aqueous azure A (38). To check the

position of CyPB, the gel was transferred onto nitrocellulose (Sartorius, Göttingen, Germany) and immunostained with specific rabbit polyclonal anti-CyPB antibodies as described (19). ANTS-labeled oligosaccharides were mixed in electrophoresis buffer, supplemented with 60% glycerol (8:2, v/v), and subjected to electrophoresis in a 20% (w/v) native polyacrylamide gel (1  $\mu$ g per lane, 5  $\mu$ l). Electrophoresis was carried at 100 V for 1–2 h at 4 °C in an SE 250 Mighty Small II mini-gel system (10  $\times$  8 cm) (Hoefer). At the end of the electrophoresis, images were acquired with the gel Doc 2000 Image analysis apparatus from Bio-Rad, equipped with a 365 nm UV-transilluminator. Analysis was performed with the supplied software Quantity One.

**Flow Cytometry Analysis**—Phenotype of peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was determined by incubating cells (5  $\times$  10<sup>5</sup> cells per sample) in Dulbecco's phosphate-buffered saline containing 0.5% BSA (DPBS/BSA) supplemented with the appropriate monoclonal anti-CD antibodies or the respective isotype-matched control IgG for 1 h at 4 °C (28). After washing, cells were labeled for 1 h at 4 °C with fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG (1/64). For the detection of cell surface HS, T cells were first washed rapidly in DPBS containing 0.6 M NaCl, in order to remove cationic molecules that could mask HS epitopes, and thereafter incubated with mouse monoclonal anti-HS antibody (clone MAB2040, Chemicon Int., Temecula, CA; 1/100) or irrelevant control antibodies (1/2000) for 1 h at 4 °C in DPBS/BSA. After washing, fluorescein-conjugated anti-mouse IgM antibodies were added for another 1-h incubation. Cells were washed twice and immediately used for analysis. Data were monitored on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) and analyzed with Cellquest software. Results are expressed as variations of fluorescence mean values ( $\Delta$ FMV %) (28).

**Cell Binding Assays**—For competitive binding assays, interaction between CyPB and cell surface HS was performed in 96-well microtiter plates (Nunc-Polylabo, Strasbourg, France), essentially as described (18). Briefly, peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (10  $\times$  10<sup>6</sup> cells per ml in DPBS/BSA) were allowed to adhere to immobilized CyPB (1  $\mu$ g per well) in the presence of increasing concentrations of heparin derivatives for 1 h at 20 °C. After washing with PBS, adherent cells were fixed with 3% (v/v) formaldehyde, pH 7.8, stained with 1% (w/v) methylene blue in 100 mM borate buffer, pH 8.2, and then lysed with 0.1 M HCl. The absorbance, which is proportional to the number of adhered cells, was measured at 590 nm with a microplate Bio-Rad reader model 550. Cell adhesion was estimated by using standard curves in which absorbance was related to cell numbers. Results were obtained from at least three separate experiments performed with CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from different donors and are expressed as percentage of initially added cells that remained fixed to the adhesive substrate. Statistical significance was determined using the Student's *t* test, and *p* values <0.05 were considered as significant.

**Semi-quantitative RT-PCR**—Total RNA was extracted from 5  $\times$  10<sup>6</sup> cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Reverse transcription was performed from 2  $\mu$ g of total RNA with an oligo(dT) primer and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). The PCRs

## Involvement of GlcNH<sub>2</sub>3S in CyPB Binding to HS

were carried out using Readymix RedTaq PCR mix. The synthetic primers for 3-OST-1, -2, -3A, -3B, -4, -5, and -6 were designed according to the published cDNA sequences (NCBI accession numbers: NM\_005114, NM\_006043, NM\_006042, NM\_006041, NM\_006040, NM\_153612 and NM\_001009606, respectively). Primer sets and expected sizes of PCR products were as follows: 3-OST-1, 5'-TTC CCT GCT GCG GCA CTT CAT-3' (sense) and 5'-ACG GGT AGG GCT TGT GCT TCT-3' (antisense), product size 582 bp; 3-OST-2, 5'-GAA TAA GCC CAC GAA AGG AAA-3' (sense) and 5'-TAT GGG CAG AAA GGA GAA TGA-3' (antisense), product size 272 bp; 3-OST3A, 5'-GAG GCG GCC TGG GAA GAA GAG T-3' (sense) and 5'-AGC TGC GGT CGA AGA AGT GGG-3' (antisense), product size 247 bp; 3-OST-3B, 5'-ACT CCC CAA GCC CCA TCT CCA-3' (sense) and 5'-ATG AGG CCC GCT GTC CTG TTT-3' (antisense), product size 433 bp; 3-OST-4, 5'-GAA GCC TTC TTT CCA AGA GCC-3' (sense) and 5'-GGT AAG GTA ACC TCC CAC CAA-3' (antisense), product size 232 bp; 3-OST-5, 5'-ACT GGG AGG ACA TTG AAC TGG-3' (sense) and 5'-AAA GAT GCG ACT ATG CAG ACA-3' (antisense), product size 239 bp; 3-OST6, 5'-CGA AGC TGA TCG TGG TGG TGC-3' (sense) and 5'-CCC TTG GTG GCG TTG AAG TAG AAG-3' (antisense), product size 334 bp. Optimal semi-quantitative PCR conditions were established to remain in the exponential phase of amplification. The following conditions were retained: 32 cycles of reaction consisting of 60 s for denaturation at 94 °C, 60 s for annealing at 60 °C for 3-OST-1, -2, -3B, -5, and -6, and at 67 °C for 3-OST-3A and -4, and 90 s for elongation at 72 °C. The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was amplified in each sample to normalize for total mRNA input and confirm efficiency of complementary DNA synthesis. The amplification products were separated by electrophoresis in 2% (w/v) agarose gel containing ethidium bromide and analyzed. Images were acquired with the Gel Doc 2000 Image analysis apparatus and analyzed with the supplied software Quantity-One (Bio-Rad). The sequence of each amplified product was confirmed by sequencing (Genoscreen, Lille, France).

**RNA Interference**—Synthetic siRNA duplexes with symmetric 3'-deoxythymidine overhangs (Eurogentec, Seraing, Belgium) were used to carry out RNA interference. A synthetic siRNA duplex (si3-OST-3), corresponding to the 3-OST-3 mRNA sequence 5'-CGG ACA AGC ACU UCU ACU UTT-3' (nucleotides 1808–1826 and 1295–1313 of human 3-OST-3A and 3-OST-3B sequences, respectively), was used to inhibit the expression of mRNAs encoding 3-OST-3 isoforms. The sequence was subjected to a BLAST search analysis, and no significant identity to others sequences could be detected. To check the specificity of the RNA interference, a siRNA duplex (siGFP) corresponding to GFP was used as a negative control, 5'-GAA CGG CAU CAA GGU GAA CTT-3'. Cells were transfected with 2 μg of siRNA duplexes in serum-free medium using DreamFect reagent (OZ-Biosciences, Marseilles, France), according to the manufacturer's instructions. To monitor the transfection efficacy, a fluorescein-tagged siRNA duplex was used, and the transfection rate was evaluated by fluorescence-activated cell sorter and found to be >85%. The cell responsiveness to CyPB was analyzed 72 h post-transfection.

**Analysis of p44/42 MAPK Activation**—Jurkat T cells were cultured overnight in the absence of serum and then stimulated by 50 nM CyPB at 37 °C. At various times, cells ( $2 \times 10^6$  per sample) were washed in cold PBS and lysed for 3 h at 4 °C in 100 μl of lysis buffer (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 20% (v/v) glycerol) supplemented with 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, and protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). The lysates were clarified by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 30 min at 4 °C and used for immunoblotting. Proteins were separated on 10% (w/v) SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The blots were blocked for 1 h at room temperature in 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.6 (TBS-T TBS-T, Tris-buffered saline/Tween 20), supplemented with 3% (w/v) BSA. Membranes were then incubated for 2 h at room temperature with the appropriate primary antibodies in TBS-T supplemented with 1% (w/v) BSA. After washing, immunoreactive proteins were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1-h incubation, 1/5000), by using a chemiluminescence detection kit (ECL) (Amersham Biosciences).

## RESULTS

**Kinetics of CyPB Binding to Heparin-derived Oligosaccharides**—We recently reported that an octasaccharide is the minimal structural unit that interacts with CyPB in solution (19). To extend these results, the kinetics of the interactions between CyPB and reducing-end biotinylated oligosaccharides immobilized on a streptavidin-derivatized cuvette were determined in an optical biosensor. As expected, CyPB failed to bind to a biosensor surface where hexasaccharide has been immobilized. Conversely, the binding of CyPB to an octasaccharide was typical (Fig. 1A). The binding reaction was fast because it reached a maximum extent within 2–3 min. Importantly, binding was always monophasic, and there was no evidence for secondary binding sites. Thus, the distribution of the data points around a one-site model was random and within the limits of instrument noise (Fig. 1B). Moreover, the plot of  $k_{on}$ , which represents the observed on-rate, determined using a one-site binding model, against concentrations of CyPB was linear, indicating that binding was not limited by diffusion (Fig. 1C). The interaction of CyPB with the longer oligosaccharide was similarly monophasic (data not shown), and thus a one-site binding model was used for all data analyses (Table 1). The association rate constant ( $k_a$ ) of CyPB for octasaccharides was relatively fast. Increasing the length from dp8 to dp14 did not change significantly the value of  $k_a$ . The dissociation rate constant ( $k_d$ ) was measured independently using high concentration of CyPB and including heparin (100 μg/ml) in the dissociation buffer to prevent re-binding (34). Overall,  $k_d$  did not vary with the length of the oligosaccharides. Therefore, the dissociation constant ( $K_d$ ) for the interaction between CyPB and oligosaccharides, determined from the kinetic parameters, was similar and in the range of 10–50 nM (Table 1). The  $K_d$  of CyPB for the oligosaccharides was also calculated from the amount of CyPB binding observed near equilibrium. Overall, the values correspond to those determined from the kinetic parameters. Therefore, binding data are internally self-consistent and are likely to reflect the intrinsic

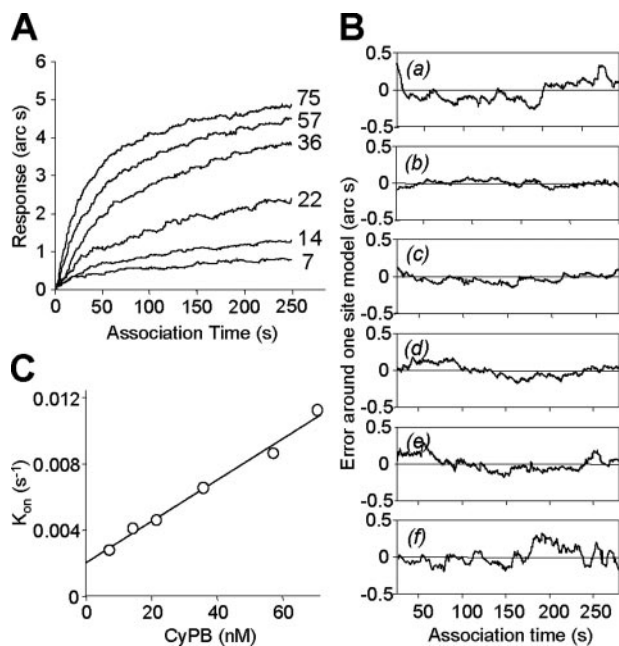
values for these interactions. Moreover, these values are close to the one previously described for CyPB binding to cell surface HS ( $K_d \sim 10$  nM) (20), indicating that the use of optical biosensor to examine the interactions between CyPB and immobilized oligosaccharides reports accurately on the binding of CyPB to heparin/HS.

**Competitive Binding Assays with Chemically Modified Heparins**—To examine the structural features of heparin that are required for CyPB binding, we first used a streptavidin-coated cuvette for which immobilization of heparin was performed through biotinylation of internal free amino groups

(Fig. 2A, panel a). Indeed, we have routinely used this biosensor surface to examine the interactions with FGF-2 and HGF (32, 33, 36). As reported previously, we found that FGF-2, for which *N*- and 2-*O* sulfate groups are the main structural requirements for interaction with heparin (6, 7, 30), efficiently bound to this biosensor surface. In contrast, CyPB failed to interact with heparin immobilized via its internal free amino groups. Binding was indeed not distinguishable from nonspecific interaction, even at a concentration of 12.5  $\mu$ M equivalent to 1000  $\times$   $K_d$ . Therefore, the procedure of heparin immobilization, which led to unavailability of GlcNH<sub>2</sub> residues and/or surrounding environment, was probably related to the inability of CyPB to interact with this biosensor surface.

The use of biotinylated albumin-heparin conjugate has been already reported to provide heparin biosensor surface with high binding capacity (39). As expected, both FGF-2 and CyPB were found to bind to the heparin-BSA conjugate immobilized onto a streptavidin-derivatized cuvette (Fig. 2A, panel b). Surprisingly, a 3-fold lower response was observed, however, in the binding reaction with CyPB compared with FGF-2. CyPB and FGF-2 have similar molecular masses (21 and 18 kDa, respectively), and both the ligands were used at a concentration equivalent to 5  $\times$   $K_d$ . Moreover, we checked that biotinylation of heparin-BSA conjugate did not lead to partial derivatization of free amino groups of the heparin moiety, indicating that the conjugate allows access of ligands to the full length of heparin. Nevertheless, the overall content of unsubstituted amino groups is very low in heparin by comparison with *N*- and 2-*O*-sulfated groups. Thus, the difference in the binding of CyPB and FGF-2 to immobilized heparin-BSA conjugate is likely to be due to limiting structural features in heparin that enables interaction with CyPB.

The kinetics of the interaction of CyPB with immobilized heparin-BSA conjugate was similar to the ones observed with oligosaccharides immobilized via reducing-end biotinylation. Binding was always monophasic, and no evidence was found for secondary binding sites (Fig. 2B). The dissociation constant calculated from the maximum extent of binding ( $K_d$  equilibrium) was similar to the value calculated from the kinetic parameters, indicating that these binding data are internally self-consistent (Table 1). Interestingly, CyPB possessed a relatively fast  $k_a$  for the heparin-BSA conjugate compared with immobilized oligosaccharides. Nevertheless, the  $K_d$  values were in the same range



**FIGURE 1. Binding of CyPB to immobilized heparin octasaccharides.** The binding kinetics of CyPB to octasaccharides immobilized via reducing-end biotinylation was measured as described under "Experimental Procedures." Data shown are the result of one representative experiment of three. *A*, representative set of binding interactions of CyPB with octasaccharides. CyPB at different concentrations was added to an octasaccharide-derivatized cuvette, and the association reaction was followed for 250 s, by which time at least 90% of the fitted one site binding curve was covered. The concentrations of CyPB in nM is indicated. *B*, distribution of the data points (jagged line) around a one-site binding model is shown for each of the concentrations of CyPB used in the binding assay in *A*. Instrument noise was  $\pm 0.5$  arc s. Concentrations of CyPB are as follows: panel a, 7 nM; panel b, 14 nM; panel c, 22 nM; panel d, 36 nM; panel e, 57 nM; and panel f, 75 nM. *C*, plot of the  $k_{on}$ , calculated by nonlinear regression from the curves in *A*, using a one-site binding model, against concentrations of CyPB.

**TABLE 1**  
Kinetics of CyPB binding to immobilized oligosaccharides and heparin-BSA conjugate

Binding parameters were determined in an optical biosensor ("Experimental Procedures").

	$k_a^a$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$	$r^b$	$k_d^c$ $s^{-1}$	$K_d$ (kinetic) <sup>d</sup> nM	$K_e$ (equilibrium) <sup>e</sup> nM
<b>Length of oligosaccharides</b>					
-dp8	127,000 $\pm$ 88,000	0.924	0.0021 $\pm$ 0.0004	16 $\pm$ 4	36 $\pm$ 9
-dp10	104,000 $\pm$ 66,000	0.905	0.0028 $\pm$ 0.0003	27 $\pm$ 4	28 $\pm$ 7
-dp12	93,000 $\pm$ 35,000	0.908	0.0033 $\pm$ 0.0005	35 $\pm$ 13	45 $\pm$ 5
-dp14	196,000 $\pm$ 61,000	0.921	0.0025 $\pm$ 0.0002	13 $\pm$ 3	29 $\pm$ 7
<b>Heparin-BSA conjugate</b>	644,000 $\pm$ 196,000	0.923	0.0106 $\pm$ 0.0015	16 $\pm$ 8	14 $\pm$ 4

<sup>a</sup> S.E. of the  $k_a$  was derived from the deviation of the data from a one-site binding model, calculated by matrix inversion using the FastFit software provided with the instrument.

Three independent sets of  $k_{on}$  were measured, and the three resulting values for  $k_a$  and their errors were combined.

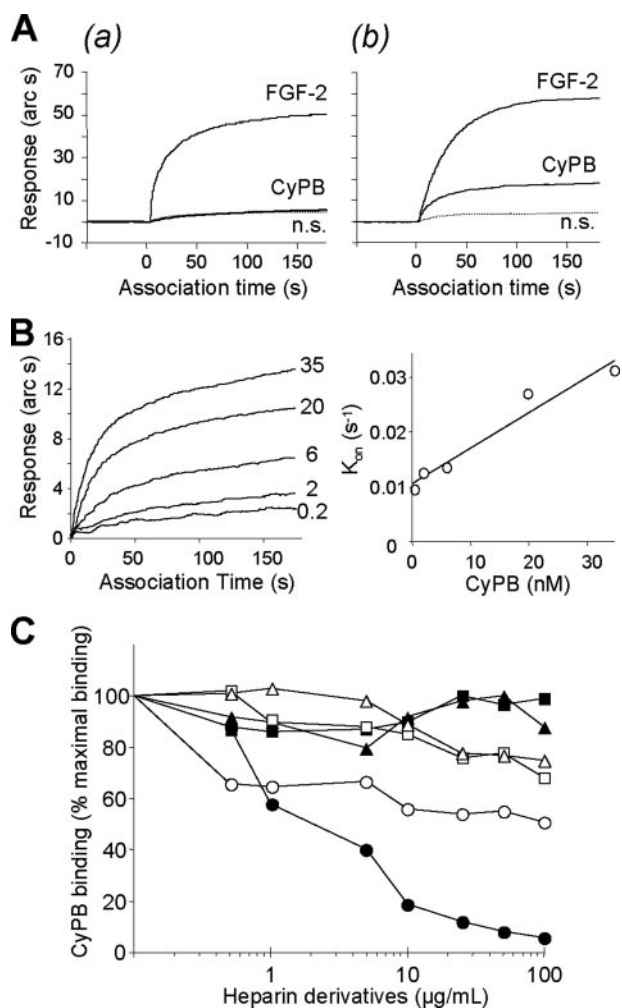
<sup>b</sup> The correlation coefficient of the linear regression through the  $k_{on}$  values is represented by  $r$ .

<sup>c</sup> The  $k_d$  is the mean  $\pm$  S.E. of five values, obtained at high concentrations of CyPB, in the presence of competing heparin.

<sup>d</sup> The  $K_d$  (kinetic) was calculated from the ratio of  $k_d/k_a$ , and its S.E. is the combined S.E. of the two kinetics parameters.

<sup>e</sup> The  $K_d$  (equilibrium) was calculated from the extent of binding at equilibrium, and its S.E. is the combined S.E. of three independent determinations of  $K_d$ .

## Involvement of GlcNH<sub>2</sub>3S in CyPB Binding to HS



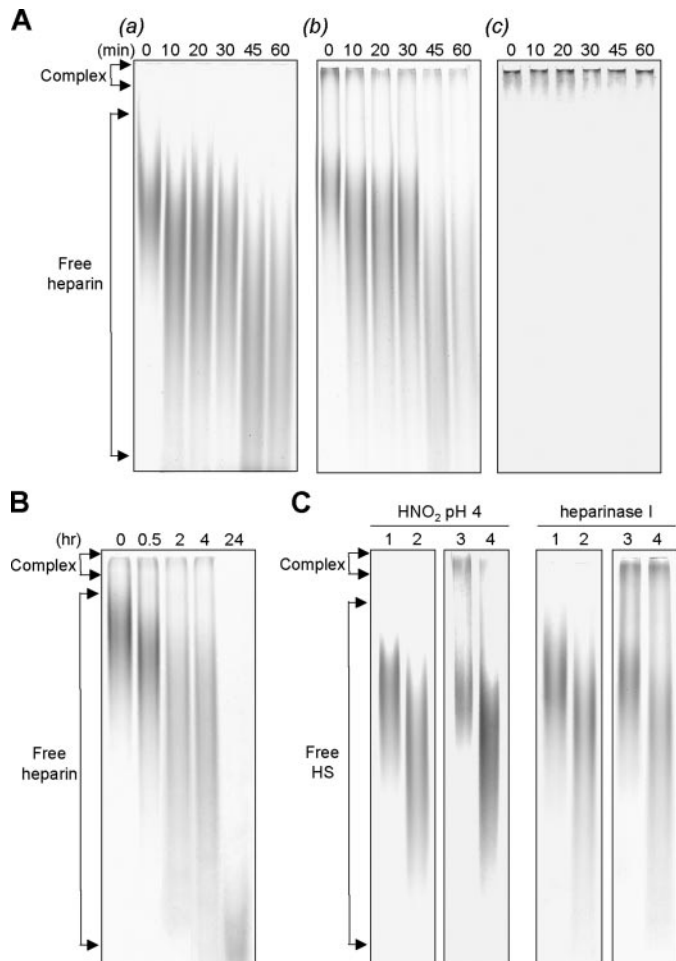
**FIGURE 2. Competition of CyPB binding to immobilized heparin by chemically modified heparin derivatives.** A, binding reactions of CyPB (75 nM) and FGF-2 (60 nM) to heparin were analyzed by using streptavidin-coated cuvettes where heparin was immobilized either via direct biotinylation of internal free amino groups of the polysaccharide (*panel a*) or via interaction with biotinylated BSA-heparin in which heparin was conjugated to the protein moiety through its reducing end (*panel b*). Nonspecific binding (*n.s.*) was obtained by adding CyPB to a streptavidin-coated cuvette in the absence of immobilized heparin. Data are representative of three independently performed experiments. B, binding kinetics of CyPB to biotinylated heparin-BSA conjugate was measured as described under "Experimental Procedures." CyPB at different concentrations was added to a cuvette where heparin was immobilized via interaction with biotinylated BSA-heparin conjugate, and the association reaction was followed until at least 90% of the fitted one-site binding curve was covered. The concentrations of CyPB in nM are indicated on the representative set of binding interactions of CyPB with heparin. Plot of the  $k_{on}$ , calculated by nonlinear regression using a one-site binding model, against concentrations of CyPB, is shown. C, for competitive binding experiments, the extent of binding of CyPB (75 nM) to heparin immobilized on an aminosilane surface was measured in the presence of increasing concentrations of unmodified (●) or modified heparins: *N*-desulfated (■), *N*-desulfated-*N*-reacetylated (▲), *N*-acetylated (○), 2-*O*-desulfated (□), and 6-*O*-desulfated (Δ) heparin derivatives. Maximal binding of CyPB in the absence of competing heparins was 20 arc s. The amount of CyPB bound to immobilized heparin was calculated as a percentage of this maximal value. Errors for individual points were less than 5% of the mean values and are omitted for clarity. Data are representative of three independently performed experiments.

as those obtained for interactions with oligosaccharides immobilized via reducing-end biotinylation, because of a higher  $k_a$  (Table 1). The differences in the rate constants probably reflect the fact that the probability of binding events was higher for heparin compared with the one for oligosaccharides, per-

haps because access to the full length of the polysaccharide may facilitate encounter with structural information that enables interaction with CyPB.

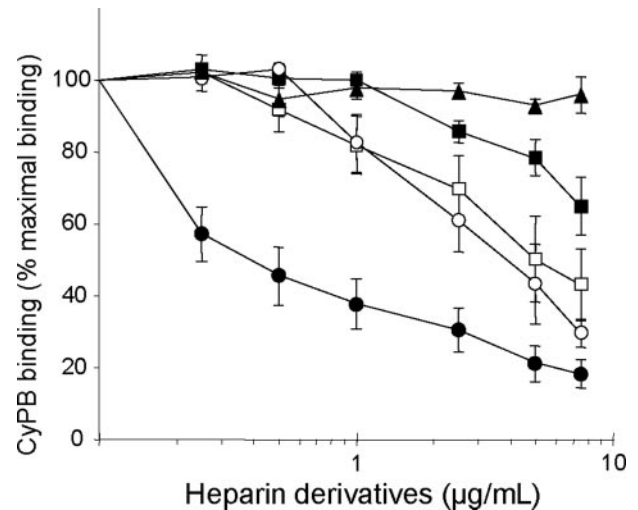
To identify these structural features, the capability of chemically modified heparins to compete for CyPB binding to immobilized heparin was then analyzed (Fig. 2C). Unmodified heparin was used as a control to ensure that soluble heparin concentrations were high enough to get a full inhibition of CyPB binding to the cuvette. The  $IC_{50}$  of soluble unmodified heparin was found at around 2 μg/ml, and more than 90% of CyPB binding could be competed with 25 μg/ml heparin. In contrast, *N*-desulfated and *N*-desulfated/*N*-reacetylated heparins were far less effective competitors of CyPB binding to immobilized heparin, because high concentrations of these two chemically modified heparins only reduced CyPB binding by 20%. In the same way, 2-*O*- and 6-*O*-desulfated heparins were poor competitors. These data indicate that 6-*O*-, 2-*O*-, and *N*-sulfated groups are crucial for the interaction between CyPB and heparin. These results are, however, not surprising because involvement of sulfated groups for efficient binding is a common feature of numerous heparin-binding proteins. Interestingly, *N*-acetylated heparin was not as efficient as unmodified heparin to inhibit CyPB binding onto the cuvette. No more than 50% of inhibition could be obtained in the presence of high concentrations of this chemically modified heparin. The modification of this heparin derivative was acetylation of unsubstituted amino groups, further indicating that unsubstituted amino groups are critically required for CyPB binding to heparin. Taken together, these data suggest that CyPB does require unusual and rare modification in addition to sulfation to interact with heparin.

**Involvement of GlcNH<sub>2</sub> in CyPB Binding to Heparin and Cell Surface HS**—In the next experiments, we analyzed the requirement of free amino group of GlcNH<sub>2</sub> in the binding of CyPB to heparin and cell surface HS derived from peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells. To this end, we used an approach based on the ability of HNO<sub>2</sub> at pH 4.0 to specifically target GlcNH<sub>2</sub> residues within heparin/HS and convert them to terminal 2,5-anhydromannose residues (37). Thereafter, the binding of CyPB to chemically treated heparin or HS was visualized by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). HNO<sub>2</sub> treatment of heparin at pH 4.0 produced oligosaccharides whose size decreased for the first 45 min and remained unchanged thereafter (Fig. 3A, *panel a*). We previously reported that the minimal length unit for CyPB binding was an octasaccharide (19). Interestingly, most of the oligosaccharides produced by HNO<sub>2</sub> treatment at pH 4.0 were of  $dp \geq 14$ , ruling out the possibility that a loss in CyPB binding was because of the presence of short heparin-derived products. In the absence of any treatment, CyPB formed a complex with heparin, which was retained at the top of the gel. The intensity of the complex decreased over the time course of degradation by HNO<sub>2</sub>, suggesting that the cleavage of heparin at GlcNH<sub>2</sub> residues paralleled the loss of binding sites for CyPB. Indeed, 20 min of HNO<sub>2</sub> treatment reduced the intensity of the complex by 50%, whereas no more than 20% of the protein was retained after 45 min of treatment (Fig. 3A, *panel b*). To confirm these findings, the gel was transferred onto nitrocellulose and immunostained with anti-CyPB anti-



**FIGURE 3. Involvement of free amino groups in the binding of CyPB to heparin and cell surface HS.** *A*, heparin was treated with nitrous acid, pH 4.0, for the indicated times and next subjected to electrophoresis (4  $\mu$ g per lane) in the absence (*panel a*) or presence (*panel b*) of 4  $\mu$ g of CyPB. The profile of migration of free and CyPB-bound oligosaccharides was then visualized by staining the gel with azure A. *Panel c*, gel was transferred onto nitrocellulose, and the protein was immunostained with rabbit polyclonal anti-CyPB antibodies. *B*, heparin was treated with heparinase I (0.75 unit/mg of heparin) for the indicated times and next subjected to EMSA (4  $\mu$ g per lane) in the presence of 4  $\mu$ g of CyPB. The profile of migration of free and CyPB-bound oligosaccharides was visualized by staining the gel with azure A. *C*, cell surface HS chains purified from peripheral blood T lymphocytes were either not treated (*lanes 1 and 3*) or treated (*lanes 2 and 4*) with nitrous acid, pH 4.0, for 45 min or heparinase I for 2 h. Thereafter, samples were subjected to electrophoresis (4  $\mu$ g per lane) in the absence (*lanes 1 and 2*) or the presence of 4  $\mu$ g of CyPB (*lanes 3 and 4*). The profile of migration of free and CyPB-bound oligosaccharides was visualized with azure A. Representative gels of at least three separate experiments are shown.

bodies. As expected, the protein was only visualized at the top of the gel, indicating that interaction of CyPB with oligosaccharides did not lead to the formation of small complexes that could migrate within the gel (Fig. 3*A*, *panel c*). To obtain further evidence on the crucial role of GlcNH<sub>2</sub> residues, we then tested the interaction of CyPB with oligosaccharides obtained from digestion with heparinase I, which preferentially cleaves heparin and HS at GlcNS  $\pm$  6S-IdoA2S linkages but has no activity on GlcNH<sub>2</sub> residues (27, 40). As expected, partial digestion of heparin, which generated large oligosaccharides higher than dp14, did not significantly reduced the intensity of the complex. Conversely, long term depolymerization of heparin by heparinase I (24-h incubation) led to a dramatic loss in CyPB binding,

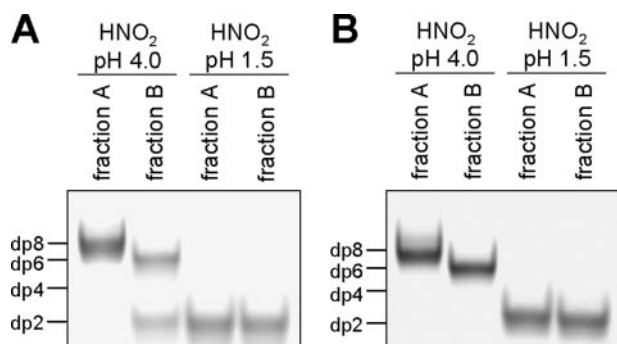


**FIGURE 4. Inhibitory effect of *N*-modified heparin derivatives on the binding of purified T lymphocytes to immobilized CyPB.** Cells were allowed to adhere into CyPB-coated plates (1  $\mu$ g per well) in the absence (control) or presence of increasing concentrations of heparin derivatives: unmodified (●), *N*-desulfated (■), *N*-desulfated-*N*-reacetylated (▲), *N*-acetylated (○) heparins, and heparin-derived oligosaccharides obtained by treatment with nitrous acid, pH 4.0 (□). Results are expressed as percentages of cells remaining associated to the coated well by comparison with control. Data are means  $\pm$  S.E. of triplicates from at least three separate experiments.

which was because of the generation of short oligosaccharides (Fig. 3*B*). We then reproduced the same experiment with cell surface HS. As already described (19), the interaction between CyPB and HS derived from CD4<sup>+</sup> T lymphocytes could be visualized as a shifted band at the top of the gel. A 45-min treatment by HNO<sub>2</sub> at pH 4.0 reduced by 80% the intensity of the complex, indicating that cleavage of HS at GlcNH<sub>2</sub> residues dramatically reduced the binding of CyPB. Conversely, partial digestion of HS with heparinase I (2-h incubation) did not significantly reduce the intensity of the complex (Fig. 3*C*). Therefore, these data indicate that only part of the GlcNS content would be necessary for interaction, whereas GlcNH<sub>2</sub> residues and/or the neighboring environment represent the limiting structural features that enable specific binding of CyPB to heparin/HS.

To further demonstrate the requirement of GlcNH<sub>2</sub> in the binding of CyPB to cell surface HS, we analyzed the ability of chemically *N*-modified heparins to inhibit the binding of peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to immobilized CyPB (Fig. 4). As reported previously, unmodified heparin potently inhibited the interaction between T cells and immobilized CyPB (20), with a IC<sub>50</sub> of 0.3  $\mu$ g/ml. Interestingly, a similar 50% inhibition required a 10-fold higher concentration of either *N*-acetylated heparin or oligosaccharides obtained from degradation of heparin by HNO<sub>2</sub> at pH 4.0. Taking into account that both competitors did not contain unsubstituted amino groups, these data further support a role for GlcNH<sub>2</sub> in the binding to CyPB. Finally, we found that *N*-desulfated heparin was a poor competitor, whereas *N*-desulfated/*N*-reacetylated heparin was devoid of any inhibitory properties. Altogether, these results clearly demonstrate that the efficient binding of CyPB to cell surface HS of peripheral CD4<sup>+</sup> T lymphocytes requires interaction with both GlcNS and GlcNH<sub>2</sub> residues.

## Involvement of GlcNH<sub>2</sub>3S in CyPB Binding to HS



**FIGURE 5. Analysis of the *N*-substituent pattern of CyPB-binding octasaccharides by nitrous acid degradation.** Following incubation of heparin-derived octasaccharides with CyPB, nonspecific octasaccharides (*fraction A*) were separated from the complex formed by the association of CyPB with specific octasaccharides by gel filtration. Thereafter, the complex was dissociated by treatment with 1 M NaCl, and CyPB-specific octasaccharides (*fraction B*) were separated from the protein by gel filtration. *A*, electrophoresis of octasaccharides after scission with nitrous acid at either pH 4.0 or pH 1.5. Fractions A and B were individually treated with nitrous acid. The cleavage products were then derivatized with ANTS and subjected to electrophoresis (1  $\mu$ g of initially treated octasaccharide per lane). *B*, electrophoresis of ANTS-labeled octasaccharides after treatment with nitrous acid at either pH 4.0 or pH 1.5. Fractions A and B were labeled with ANTS prior treatment with nitrous acid, and next subjected to electrophoresis (1  $\mu$ g per lane). The fluorescent profiles of migration of ANTS-labeled oligosaccharides were imaged after exposure to UV transilluminator for 0.60 s. The position and the degree of polymerization of standard oligosaccharides are indicated. Representative gels of three separate experiments are shown.

**Analysis of the *N*-Substituent Pattern of the CyPB-binding Heparin Unit**—We recently used an approach based on carbohydrate electrophoresis with ANTS-labeled oligosaccharides to demonstrate that an octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of CyPB to heparin and cell surface HS (19). To further confirm the involvement of a GlcNH<sub>2</sub> residue in the interactions with CyPB, we then evaluated the susceptibility of this minimal heparin unit to nitrous acid degradation. To this end, heparin-derived octasaccharides were first separated according to their capability to interact with the protein. Following gel filtration to remove unbound octasaccharides (*fraction A*), the complex formed by the association of CyPB with specific octasaccharides was incubated in the presence of 1 M NaCl, and initially bound octasaccharides were separated from the protein by gel filtration (*fractions B*). Then both fractions were individually treated with HNO<sub>2</sub>, pH 4.0, and the products of degradation were derivatized with ANTS and subjected to electrophoresis. As shown in Fig. 5A, most of the octasaccharides that did not bind CyPB were resistant to nitrous acid cleavage at pH 4.0, indicating that they did not contain any detectable amount of GlcNH<sub>2</sub> residues. In contrast, octasaccharides that bound CyPB were susceptible to HNO<sub>2</sub> cleavage at pH 4.0. Indeed, the profile of elution of treated *fraction B* was characterized by the presence of two degradation products, which corresponded to disaccharides and hexasaccharides. Moreover, an estimation of relative amounts of each product suggested the presence of a single GlcNH<sub>2</sub> unit per octasaccharide. In parallel experiments, the same fractions were subjected to low pH nitrous acid treatment, which results in specific scission at *N*-sulfated disaccharides with a concomitant loss of the *N*-sulfate groups. Treatment of *fraction A* essentially resulted in the liberation of disaccharides, indicating that unbound octasaccharides mainly contained GlcNS resi-

dues. This result was expected because the major disaccharide unit in heparin is IdoUA2S-GlcNS6S. Surprisingly, treatment of *fraction B* also resulted in the liberation of disaccharides. We could expect that these oligosaccharides, which contain GlcNH<sub>2</sub> residues, were partially resistant to attack by low pH nitrous acid and generated degradation products larger than disaccharides. Such an unexpected cleavage was however reported by Liu *et al.* (23, 24), who demonstrated that low pH nitrous acid also targets 3-*O*-sulfated GlcNH<sub>2</sub> residues within heparin sequence. Therefore, these data indicate that the heparin-derived octasaccharide that binds CyPB is likely to contain one 3-*O*-sulfated GlcNH<sub>2</sub> and neighboring GlcNS  $\pm$  6S.

We therefore used the same approach to obtain information on the position of the GlcNH<sub>2</sub> residue within the binding heparin unit. To this end, octasaccharides of both the fractions A and B were first labeled with ANTS at the reducing end of the molecule and then treated with HNO<sub>2</sub>, pH 4.0. The products of hydrolysis were subsequently separated by electrophoresis (Fig. 5B). The ANTS moiety served as a tag to differentiate oligosaccharides derived from the reducing end of the parent compounds. Treatment of *fraction B* resulted in the liberation of a fluorescent product that migrated as dp6 standard. No fluorescent disaccharides could be visualized, indicating that the heparin unit that interacts with CyPB contains a GlcNH<sub>2</sub> at position 2 from the nonreducing end of the octasaccharide. As expected, the degradation products obtained from the *fraction A* migrated as dp8 standard. Finally, treatment of both fractions at pH 1.5 resulted in the liberation of disaccharides, thus confirming the preceding findings. Altogether, these results indicate that CyPB does not bind to octasaccharides for which GlcNH<sub>2</sub> residues are lacking or not correctly positioned.

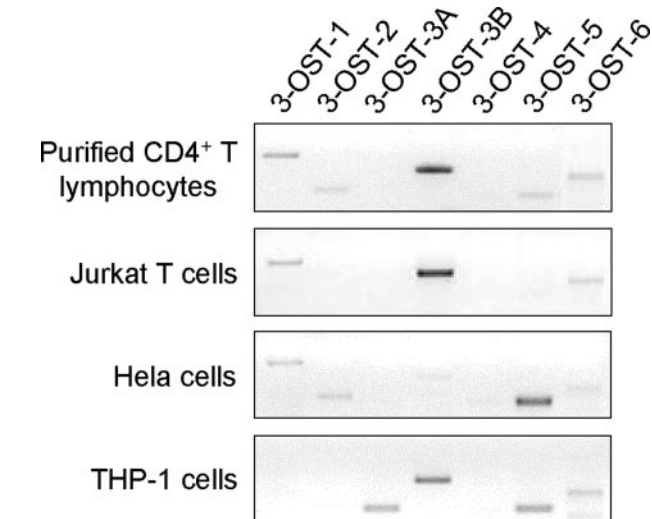
**Role of 3-OST-3 in the Generation of Binding Sites for CyPB**—The different 3-OST isoforms exhibit distinct substrate specificities and thereby generate specialized HS sequences with diversified biological functions. For instance, 3-OST-3 isoenzymes, which are represented by two closely related isoforms with similar substrate specificity, *i.e.* 3-OST-3A and 3-OST-3B, introduce a sulfate substituent to the 3-OH position of GlcNH<sub>2</sub> residues within the disaccharide unit IdoUA2S-GlcNH<sub>2</sub>  $\pm$  6S and thereby generate a 3-*O*-sulfated GlcNH<sub>2</sub> residue within the HS (23, 24). To test whether the presence of GlcNH<sub>2</sub> residue is correlated with the ability of 3-OST to generate a binding unit for CyPB, we analyzed by RT-PCR the relative expression of 3-OST isoenzymes in responsive T cells. As shown in Fig. 6, purified CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and Jurkat T cells predominantly expressed mRNA encoding 3-OST-3B, whereas other 3-OST isoforms were only slightly detected or absent. As control, we then analyzed the expression pattern of mRNAs encoding 3-OST isoenzymes in epithelial HeLa cells and promonocytic leukemia THP-1 cells. Indeed, we recently reported that THP-1 cells are highly responsive to CyPB, by a mechanism dependent on the interactions with cell surface HS (29). In contrast, we have observed that although HeLa cells produce high levels of HS by comparison with T lymphocytes, they are devoid of high affinity binding sites for CyPB (data not shown). Interestingly, we found that THP-1 cells mainly express mRNAs encoding 3-OST-3A, 3-OST-3B, and 3-OST-5. Conversely, 3-OST-5 was the main isoenzyme expressed in HeLa cells, whereas

mRNAs that encode 3-OST-1, 3-OST-2, 3-OST-3B, and 3-OST-6 were barely detected. Therefore, the findings that high expression of mRNA encoding 3-OST-3 isoenzymes correlates with cellular binding of CyPB supports the hypothesis

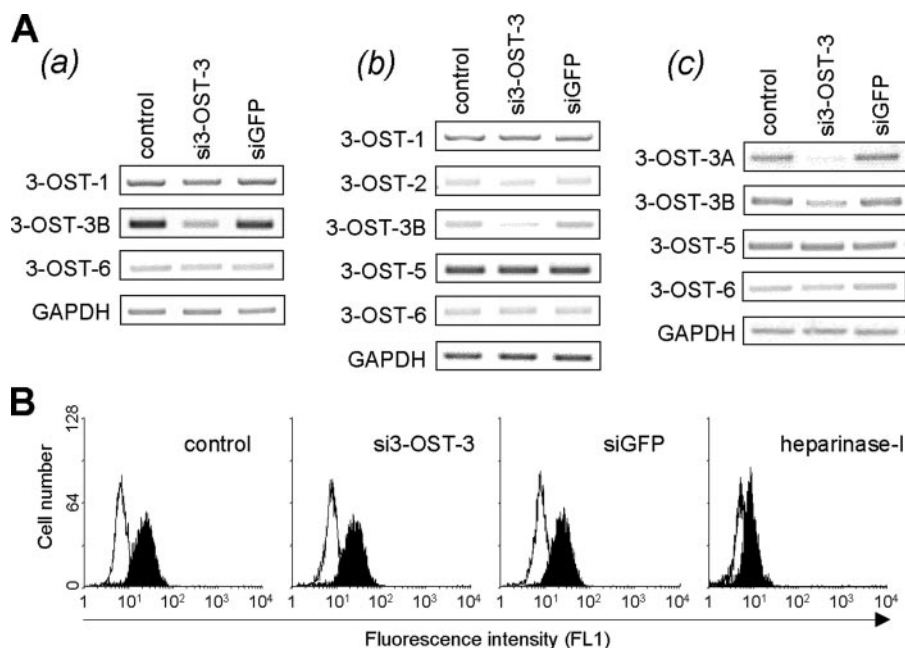
that the GlcNH<sub>2</sub> residue present in the HS motif that interacts with CyPB could be 3-O-sulfated.

To gain insights into the relationships between 3-OST-3 expression and generation of binding sites for CyPB, we then developed a model based on the use of RNA interference. The 3-OST-3 siRNA was first tested for its ability to suppress mRNAs encoding 3-OST-3 isoforms specifically (Fig. 7A). As expected, transfection of Jurkat T cells and HeLa cells resulted in a significant 3-OST-3B mRNA down-regulation. Inhibition was found to reach 90% at day 2 in Jurkat T cells, by comparison with control cells. A significant decrease in the expression of mRNAs encoding 3-OST-3A and 3-OST-3B was also observed in THP-1 cells, indicating that the siRNA was efficient to reduce the expression of both the 3-OST-3 isoforms. Moreover, the expression of other mRNAs encoding 3-OST isoforms was not affected in Jurkat T cells, HeLa cells, and THP-1 cells, indicating that the siRNA specifically targets 3-OST-3 isoforms. Finally, no significant decrease in the expression of mRNAs encoding 3-OST-3 or other 3-OST isoforms could be detected in the presence of irrelevant siRNA, confirming the specificity of the method. We then examined the effect of 3-OST-3 mRNA down-regulation on the expression of cell surface HS by flow cytometry (Fig. 7B). As expected, transfection of Jurkat T cells with 3-OST-3 siRNA did not significantly modify the cell surface immunostaining with anti-HS antibodies, by comparison with nontransfected cells or cells transfected with irrelevant siRNA ( $\Delta\text{FMV} = 198 \pm 21\%$  versus  $219 \pm 18$  and  $191 \pm 25\%$ , respectively). As a control, we found a 4-fold decrease in cell surface immunostaining following treatment with heparinase I ( $\Delta\text{FMV} = 56 \pm 13\%$ ), confirming that suppression of mRNA encoding 3-OST-3 had no detectable inhibitory effect on the expression of HS at the cell surface.

We then analyzed the interaction between CyPB and cell-surface HS in transfected cells. As a control, we first checked that CyPB binding was potently inhibited (>75% of initial binding) by heparinase I treatment. Interestingly, knock-down of 3-OST-3 reduced CyPB binding by more than 60%, indicating that 3-O-sulfation of GlcN residues is required for the interactions between the protein and cell surface HS (Fig. 8A). We recently demonstrated that the main intracellular event initiated by CyPB binding to T lymphocytes is the activation of the p44/42 MAPK pathway (29). When analyzing the phosphorylated status of ERK1/2, we found that transfection of Jurkat T cells with 3-OST-3 siRNA dramatically reduced the ability of CyPB to activate p44/42 MAPK, indicating that expression of 3-OST-3B is also required for the



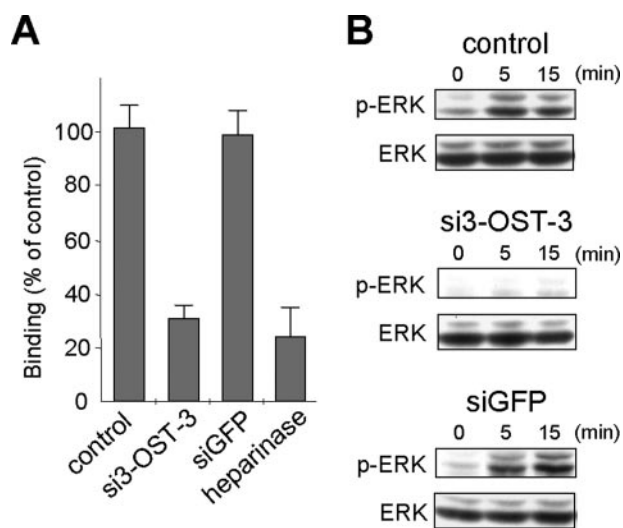
**FIGURE 6. RT-PCR analysis of the expression of mRNAs encoding 3-OST isoenzymes.** Total RNA was extracted from purified peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, lymphoblastic Jurkat T cells, epithelia HeLa cells, and leukemia promonocytic THP-1 cells, and 2  $\mu\text{g}$  was used for cDNA synthesis amplified by specific primers for individual 3-OST isoforms ( $n = 32$  cycles of amplification). The product sizes are as follows: 3-OST-1, 582 bp; 3-OST-2, 272 bp; 3-OST-3A, 247 bp; 3-OST-3B, 433 bp; 3-OST-4, 232 bp; 3-OST-5, 239 bp; 3-OST-6, 334 bp. The results shown are representative of at least three separate experiments for each cell type.



**FIGURE 7. Inhibition of the expression of mRNAs encoding 3-OST-3 isoenzymes by RNA interference.** Cells were either untreated (*control*) or transfected with siRNA for 3-OST-3 (*si3-OST-3*) or GFP (*siGFP*). *A*, expression of specific mRNAs encoding 3-OST isoenzymes was analyzed in Jurkat T cells (*panel a*), HeLa cells (*panel b*), and THP-1 cells (*panel c*) by semi-quantitative RT-PCR, 48 h post-transfection. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA was used to normalize for input of total RNA. *B*, expression of cell surface HS was analyzed in Jurkat T cells by flow cytometry. Cells were stained with either monoclonal anti-HS antibody (*filled histogram*) or isotype-matched control antibody (*open histogram*). Heparinase I-treated cells were used as a control to estimate the loss of HS at the surface of Jurkat T cells. The results shown are representative of at least three separate experiments.



## Involvement of GlcNH<sub>2</sub>3S in CyPB Binding to HS



**FIGURE 8. Involvement of 3-OST-3 in the generation of CyPB-binding sites.** *A*, involvement of 3-OST-3 in the generation of CyPB-binding sites was analyzed by measuring the binding of nontransfected (*control*) versus transfected Jurkat T cells (*si3-OST-3* or *siGFP*) to immobilized CyPB (1  $\mu$ g/well), 72 h post-transfection. Heparinase I-treated cells were used as a control to estimate the participation of HS in the interaction. Each bar of histograms represents mean  $\pm$  S.D. of triplicate. *B*, Jurkat T cells (72 h post-transfection) were either stimulated or not in the presence of 50 nM CyPB for various times, and the activation of p44/p42 MAPK was analyzed by using anti-phosphorylated ERK1/2 (*p-ERK*). Parallel immunoblotting with anti-total ERK1/2 confirmed equal loading of samples. Representative results from three independent experiments are shown.

initiation of signaling events (Fig. 8*B*). Taken together, these findings suggest that efficient binding of CyPB and consequent induction of cell responses are dependent on the presence of a specific 3-*O*-sulfated HS motif.

## DISCUSSION

The fine structure of HS varies considerably depending on the tissue of origin, developmental stage, and pathophysiological conditions, and it is thought that rare structural sequences within HS species contribute to selective protein binding. Such a diversity of structure is imposed by tightly regulated patterns of sulfation and epimerization upon the basic polysaccharide backbone during synthesis within the Golgi (1–4). We have reported that HS are absolutely required for CyPB to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T cells to the extracellular matrix (11). In this study, we attempted to determine the structural features of HS that are responsible for the specific binding of CyPB to responsive cells.

To gain insights into the relationship of structural information and biological activity, we currently used heparin and its derivatives in our binding experiments, because we previously demonstrated that binding of CyPB to heparin and cell surface HS from T lymphocytes was quite similar (19, 20). In a first set of experiments, we used reducing-end immobilized oligosaccharides from dp6 to dp14 to examine the kinetics of the interactions. Indeed, the observation that different methods of immobilizing heparin onto biosensor surfaces can affect the affinity of interactions (41) has made the use of pure heparin oligosaccharides immobilized via reducing-end biotinylation more appropriate to determine the binding parameters (32, 36). Previous studies have demonstrated that the minimal binding

unit within heparin that could interact with CyPB in solution was an octasaccharide (19). As expected, we confirmed here that CyPB failed to bind to immobilized hexasaccharides. Conversely, kinetic studies showed that oligosaccharides of dp  $\geq$  8 all bind CyPB and that the affinity for octasaccharides is similar to that for longer oligosaccharides. We then examined the structural features of heparin that are required for CyPB binding. In previous works, we routinely used a streptavidin-coated cuvette for which immobilization of heparin or HS was performed via biotinylation of internal free amino groups (30, 32, 33, 35, 36). Although this method of immobilizing heparin was reported to affect the binding capacity of some proteins (41), we had not observed any significant changes in the binding affinities of FGF-2 and HGF by comparison with immobilization via reducing end of oligosaccharides (32, 36). Unfortunately, we found here that CyPB failed to bind onto this biosensor cuvette. This observation confirms that immobilizing heparin via free intrachain amino groups can dramatically affect the binding of some particular heparin-binding proteins, probably by blocking interactions with GlcNH<sub>2</sub> residues and/or surrounding environment. We then used a biotinylated albumin-BSA conjugate, in which conjugation of biotin to the protein moiety allowed access of CyPB to the full length of the polymer (39). As expected, the binding affinity  $K_d$  of CyPB for this conjugate was similar to those obtained with oligosaccharides immobilized via reducing-end biotinylation. Moreover, these values are close to the one previously described for CyPB binding to cell surface HS ( $K_d \sim 10$  nM) (20), indicating that the use of this cuvette reports accurately on the interactions between CyPB and heparin/HS. Interestingly, we observed that binding of FGF-2 to immobilized heparin-BSA conjugate was higher compared with that of CyPB. This discrepancy could not be attributed to differences in the binding affinities, because we previously reported that the  $K_d$  of FGF-2 for heparin or oligosaccharides was in the same range to that of CyPB (32, 33). Actually, *N*- and 2-*O* sulfate groups, which are the main structural requirements for interaction with FGF-2 (6, 7, 30), are not limiting structural features in heparin. In contrast, the overall content of free amino groups is very low in heparin/HS (27, 42). Thus, requirement of GlcNH<sub>2</sub> residues and/or surrounding environment for interaction is likely to represent the limiting structural information that explains the lower binding of CyPB to immobilized heparin-BSA. Competitive binding experiments performed with chemically modified heparins further support this hypothesis. We found that 2-*O*, 6-*O*, and *N*-sulfate groups were required for the binding of CyPB. These results were expected because involvement of sulfate groups is a common feature in the interaction of numerous proteins to heparin/HS. Most importantly, we also demonstrated that *N*-acetylated heparin was a poor competitor of CyPB to binding to immobilized heparin, highlighting the crucial role of free amino group of GlcNH<sub>2</sub> in the interactions.

To validate the findings obtained with the optical biosensor approach, we then analyzed the interaction of CyPB with heparin and cell surface HS by EMSA. Cleavage of heparin/HS with nitrous acid at pH 4.0, which targets GlcNH<sub>2</sub> residues, dramatically reduced the interactions with CyPB in solution. Conversely, partial digestion of heparin/HS with heparinase I did

not significantly modify the interaction with CyPB in solution. Finally, we further demonstrated that *N*-acetylated heparin or fragments of heparin treated with nitrous acid at pH 4.0 were poor competitors of CyPB to binding to the cell membrane of T lymphocytes. Altogether, these findings demonstrate that binding of CyPB is not simply the consequence of electrostatic interactions between basic residues in the protein and negative charges on the polysaccharide, but also the result of specific contacts between the protein and a rare modification in the heparin/HS-binding unit.

The occurrence of GlcNH<sub>2</sub> units was first believed to reflect artificial loss of *N*-sulfate groups during handling of HS samples. Moreover, the mechanism of GlcNH<sub>2</sub> formation during HS biosynthesis remains largely unclear. Nevertheless, accumulating data have demonstrated a functional relevance of such a modification in biological and pathological phenomena. A monoclonal antibody that recognizes GlcNH<sub>2</sub> units in HS was reported to stain basement membranes and epithelial and mesenchymal tissues (5). The presence of GlcNH<sub>2</sub> residues was found to correlate with the ability of L-selectin to bind to endothelial cells (43), although the interaction was not critically dependent on GlcNH<sub>2</sub> residues (44). It was proposed that GlcNH<sub>2</sub> residues provide a cleavage site for endogenous NO-derived nitrite and thus contribute to recycling of glypican-1 (45). The overall content of GlcNH<sub>2</sub> is generally low and varies between HS species from 1.2 to 7.5% (w/w) of total GlcN content (27, 42). GlcNH<sub>2</sub> residues are preferentially located in the transition zones between *N*-sulfated and *N*-acetylated region within HS (46, 47). Recently, Westling and Lindahl (42) have analyzed the sequences around GlcNH<sub>2</sub> residues in HS from diverse preparations. They confirmed that the GlcNH<sub>2</sub>-containing sequences are predominantly located within the *N*-acetylated domains or in transition sequences between *N*-acetylated and *N*-sulfated domains. Moreover, they found that the structures upstream and downstream of GlcNH<sub>2</sub> residues are highly diverse. Thus, 20–30% of the adjacent disaccharide units could be *N*-sulfated. Although most of the uronic acid residues immediately upstream of GlcNH<sub>2</sub> are GlcUA, some of these units may be subjected to C<sub>5</sub>-epimerization and 2-*O*-sulfation. GlcNH<sub>2</sub> residues may be also 6-*O*-sulfated and even 3-*O*-sulfated, and the highly sulfated but *N*-unsubstituted unit IdoUA2S-GlcNH<sub>2</sub> ± 6S would be located to the highly sulfated domain of HS chains. Interestingly, we demonstrated here that the GlcNH<sub>2</sub> residue within the heparin-derived octasaccharide that binds CyPB could be cleaved by low pH nitrous acid. Such an unexpected cleavage was reported by Liu *et al.* (23, 24), who demonstrated that nitrous acid at pH 1.5 also targets 3-*O*-sulfated GlcNH<sub>2</sub> residues within heparin sequence. Therefore, these data indicate that the heparin sequence that binds CyPB is likely to contain one 3-*O*-sulfated GlcNH<sub>2</sub>. We also demonstrated that the GlcNH<sub>2</sub> residue required for interaction of CyPB with heparin is located at position 2 from the nonreducing end of specific octasaccharides. In our experiments, heparinase I was used to generate heparin-derived octasaccharides. As this enzyme cleaves HS essentially where GlcNS ± 6S-IdoUA2S linkage occurs (27, 40), these data indicate that

the uronic acid residue immediately upstream to GlcNH<sub>2</sub> could be IdoUA2S, suggesting that the heparin sequence that binds CyPB probably contains the disaccharide unit IdoUA2S-GlcNH<sub>2</sub>3S ± 6S. This disaccharide unit was found to be the main GlcNH<sub>2</sub>-containing unit in intestinal HS, although it could not be detected in HS from the aorta. Moreover, GlcNH<sub>2</sub>-containing disaccharide units were also identified as targets for certain 3-OST isoforms that introduce a sulfate substituent at C<sub>3</sub> and thereby provide a binding site for HSV-1 glycoprotein gD (20, 48, 49). Altogether, these data strongly support the hypothesis that biosynthetic mechanisms, whereby GlcNH<sub>2</sub> residues are implicated, are dependent on the tissue of origin and may provide specialized and rare structural sequences that selectively interact with distinct effector proteins.

The different 3-OST isoforms are expressed at distinct levels in various human tissues, suggesting their involvement in making tissue-specific HS with different biological functions. For instance, 3-OST1 transfers sulfate groups to the 3-OH position of the GlcNS residue that is linked to a GlcUA residue at the nonreducing end (GlcUA-GlcNS ± 6S) and provides a binding site for antithrombin III (9). HS modified by 3-OST-2, -3A, -3B, -4, and -6 bind to HSV-1 gD and assist viral entry (21, 22, 50, 51). By contrast, 3-OST-5 exhibits broad substrate specificity and transfers a sulfate group on the hydroxyl group in C<sub>3</sub> of GlcNS or GlcNH<sub>2</sub> (52). To identify whether the HS sequence that binds CyPB could be 3-*O*-sulfated, we then analyzed the expression pattern of 3-OST isoenzymes in peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, Jurkat T cells, and THP-1 cells. We found that these cells, which are responsive to CyPB, mainly express mRNA encoding 3-OST-3B alone or in combination with 3-OST-3A. Interestingly, specific down-regulation of the expression of the mRNA encoding these isoenzymes by siRNA potently reduced binding of CyPB to Jurkat T cells and consequent activation of p44/42 MAPK pathway, indicating that 3-OST-3B is a key enzyme in the biosynthesis of the HS sequence involved in the interaction with CyPB. 3-OST-3 isoforms transfer sulfate groups to the 3-OH position of GlcNH<sub>2</sub> residue that is linked to an adjacent upstream IdoUA2S residue (IdoUA2S-GlcNH<sub>2</sub> ± 6S) (23, 24, 48). Therefore, the unique substrate specificity of 3-OST-3 further supports the hypothesis that the binding HS unit for CyPB contains the disaccharide unit IdoUA2S-GlcNH<sub>2</sub>3S ± 6S.

Infection by HSV-1 requires a two-step process, *i.e.* attachment followed by entry into cells, and it is known that HS are involved in assisting viral binding as well as viral entry. An HS motif containing IdoUA2S and GlcNS(Ac)6S residues is sufficient to make the initial contact with HSV-1 via interaction with the virion envelope glycoprotein gC or in some cases glycoprotein gB. After attachment, interaction with glycoprotein gD triggers the fusion between the viral envelope and cell membrane leading to entry of the virus. Several cellular receptors for HSV-1 gD have been described, including a member of the tumor necrosis factor receptor family, named HVEM, and two members of the immunoglobulin superfamily, designated as nectin-1 and nectin-2 (53, 54). In addition, a specific 3-*O*-sulfated HS was reported to give rise to another family of binding sites for gD and to assist viral entry in some target cells (21, 22,

## Involvement of GlcNH<sub>2</sub>3S in CyPB Binding to HS

50, 51). Interestingly, 3-OST-3 was suggested to provide unique binding sites for the glycoprotein gD via the generation of the disaccharide IdoUA2S-GlcNH<sub>2</sub>3S ± 6S (23, 24, 48, 49). Actually, 3-OST-3-modified HS units are rarely found in HS, suggesting that the specific HS sequence required for binding of CyPB and glycoprotein gD could be the same. In this way, our findings that mRNAs encoding 3-OST-3 isoforms were barely expressed in HeLa cells correlate with the absence of high affinity binding sites for CyPB on epithelial cells and the requirement of nectin-1 as an entry receptor for HSV-1 within these cells (49). Finally, several lines of evidence indicate that HS proteoglycans do not only stabilize the interaction of CyPB with cognate signaling receptor but also act as co-stimulatory molecules to initiate signaling events, cytoskeleton rearrangement, and integrin activation (11, 12, 19, 29). These observations suggest that HSV-1 might hijack 3-O-sulfated HS proteoglycans recognized by CyPB and take them out of their original functions to facilitate its entry within some target cells.

In conclusion, we demonstrated here that efficient binding of CyPB to HS is dependent on the presence of a GlcNH<sub>2</sub> residue and the expression of 3-OST-3 in responsive cells, supporting the notion that this interaction is the result of specific contacts between CyPB and well defined modifications in HS. Growing data suggest a role for secreted cyclophilins in the development and/or progression of physiological inflammatory responses and pathological disorders (13, 14, 55, 56). Because the interaction of cyclophilins with cell surface HS is a key step for inducing cellular signaling events, our results provide new information for further determining the regulatory functions of HS proteoglycans in assisting the activity of extracellular cyclophilins, as well as in the development of synthetic HS-derived oligosaccharides, which may serve as therapeutic agents for treating inflammatory disorders.

*Acknowledgment*—We thank J. T. Gallagher for helpful discussion.

## REFERENCES

1. Esko, J. D., and Lindahl, U. (2001) *J. Clin. Invest.* **108**, 169–173
2. Turnbull, J., Powell, A., and Guimond, S. (2001) *Trends Cell Biol.* **11**, 75–82
3. Capila, I., and Linhardt, R. J. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 390–412
4. Esko, J. D., and Selleck, S. B. (2002) *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 435–471
5. van den Born, J., Salmivirta, K., Henttinen, T., Ostman, N., Ishimaru, T., Miyaura, S., Yoshida, K., and Salmivirta, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 20516–20523
6. Turnbull, J. E., Fernig, D. G., Ke, Y., Wilkinson, M. C., and Gallagher, J. T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10337–10341
7. Guimond, S. E., and Turnbull, J. E. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 1343–1346
8. Allen, B. L., and Rapraeger, A. C. (2003) *J. Cell Biol.* **163**, 637–648
9. Shworak, N. W., Liu, J., Fritze, L. M., Schwartz, J. J., Zhang, L., Logeart, D., and Rosenberg, R. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28008–28019
10. Petitou, M., Casu, B., and Lindahl, U. (2003) *Biochimie (Paris)* **85**, 83–89
11. Allain, F., Vanpouille, C., Carpentier, M., Slomianny, M.-C., Durieux, S., and Spik, G. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2714–2719
12. Yurchenko, V., Zybarch, 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) *J. Biol. Chem.* **277**, 22959–22965
13. Arora, K., Gwinn, W. M., Bower, M. A., Watson, A., Okwumabua, I., MacDonald, H. R., Bukrinsky, M. I., and Constant, S. L. (2005) *J. Immunol.* **175**, 517–522
14. Gwinn, W. M., Damsker, J. M., Falahati, R., Okwumabua, I., Kelly-Welch, A., Keegan, A. D., Vanpouille, C., Lee, J. J., Dent, L. A., Leitenberg, D., Bukrinsky, M. I., and Constant, S. L. (2006) *J. Immunol.* **177**, 4870–4879
15. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. (1984) *Science* **226**, 544–547
16. Schreiber, S. L. (1991) *Science* **251**, 283–287
17. Carpentier, M., Allain, F., Haendler, B., Denys, A., Mariller, C., Benaïssa, M., and Spik, G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10990–10998
18. Carpentier, M., Allain, F., Slomianny, M.-C., Durieux, S., Vanpouille, C., Haendler, B., and Spik, G. (2002) *Biochemistry* **41**, 5222–5229
19. Vanpouille, C., Denys, A., Carpentier, M., Pakula, R., Mazurier, J., and Allain, F. (2004) *Biochem. J.* **382**, 733–740
20. Denys, A., Allain, F., Carpentier, M., and Spik, G. (1998) *Biochem. J.* **336**, 689–697
21. 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) *Cell* **99**, 13–22
22. Xu, D., Tiwari, V., Xia, G., Clement, C., Shukla, D., and Liu, J. (2005) *Biochem. J.* **385**, 451–459
23. Liu, J., Shriver, Z., Blaiblock, P., Yoshida, K., Sasisekharan, R., and Rosenberg, R. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 38155–38162
24. Liu, J., Shworak, N. W., Sinay, P., Schwartz, J. J., Zhang, L., Fritze, L. M., and Rosenberg, R. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5185–5192
25. Ke, L. D., Karaganis, A. G., and Shain, S. A. (1992) *Protein Expression Purif.* **3**, 497–507
26. 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) *J. Biol. Chem.* **266**, 10735–10738
27. Wei, Z., Lyon, M., and Gallagher, J. T. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15742–15748
28. Denys, A., Allain, F., Foxwell, B., and Spik, G. (1997) *Immunology* **91**, 609–617
29. Pakula, R., Melchior, A., Denys, A., Vanpouille, C., Mazurier, J., and Allain, F. (2007) *Glycobiology* **17**, 492–503
30. Rahmoune, H., Chen, H. L., Gallagher, J. T., Rudland, P. S., and Fernig, D. G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 7303–7310
31. Sasaki, H., Hayashi, A., Kitagaki-Ogawa, H., Matsumoto, I., and Seno, N. (1987) *J. Chromatogr.* **400**, 123–132
32. Delehede, M., Lyon, M., Gallagher, J. T., Rudland, P. S., and Fernig, D. G. (2002) *Biochem. J.* **366**, 235–244
33. Kinsella, L., Chen, H. L., Smith, J. A., Rudland, P. S., and Fernig, D. G. (1998) *Glycoconj. J.* **15**, 419–422
34. Fernig, D. G. (2001) *Methods Mol. Biol.* **171**, 505–518
35. Rahmoune, H., Rudland, P. S., Gallagher, J. T., and Fernig, D. G. (1998) *Biochemistry* **37**, 6003–6008
36. Delehede, M., Lyon, M., Vidyasagar, R., McDonnell, T. J., and Fernig, D. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12456–12462
37. Shively, J. E., and Conrad, H. E. (1976) *Biochemistry* **15**, 3932–3942
38. Lyon, M., and Gallagher, J. T. (1990) *Anal. Biochem.* **185**, 63–70
39. Beattie, J., Phillips, K., Shand, J. H., Szymonowska, M., Flint, D. J., and Allan, G. J. (2005) *J. Mol. Endocrinol.* **34**, 163–175
40. Yamada, S., Murakami, T., Tsudda, H., Yoshida, K., and Sugahara, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8696–8705
41. Osmond, R. J., Kett, W. C., Skett, S. E., and Coombe, D. R. (2002) *Anal. Biochem.* **310**, 199–207
42. Westling, C., and Lindahl, U. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 49247–49255
43. Norgard-Sumnicht, K., and Varki, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12012–12024
44. Celie, J. W., Keuning, E. D., Beelen, R. H., Drager, A. M., Zweegman, S., Kessler, F. L., Soininen, R., and van den Born, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 26965–26973
45. Mani, K., Jönsson, M., Edgren, G., Belting, M., and Fransson, L. A. (2000) *Glycobiology* **10**, 577–586
46. van den Born, J., Gunnarsson, K., Bakker, M. A., Kjellen, L., Kusche-Gullberg, M., Maccarana, M., Berden, J. H., and Lindahl, U. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 31303–31309
47. Ding, K., Jonsson, M., Mani, K., Sandgren, S., Belting, M., and Fransson, L. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3885–3895
48. 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) *J. Biol. Chem.* **277**, 33456–33467
49. Tiwari, V., Clement, C., Xu, D., Valyi-Nagy, T., Yue, B. Y., Liu, J., and Shukla, D. (2006) *J. Virol.* **80**, 8970–8980
50. O'Donnell, C. D., Tiwari, V., Oh, M. J., and Shukla, D. (2005) *Virology* **346**, 452–459
51. Tiwari, V., O'Donnell, C. D., Oh, M. J., Valyi-Nagy, T., and Shukla, D. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 930–937
52. Xia, G., Chen, J., Tiwari, V., Ju, W., Li, J. P., Malmstrom, A., Shukla, D., and Liu, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37912–37919
53. Shukla, D., and Spear, P. G. (2001) *J. Clin. Investig.* **108**, 503–510
54. Spear, P. G., and Longnecker, R. (2003) *J. Virol.* **77**, 10179–10185
55. Tegeder, I., Schumacher, A., John, S., Geiger, H., Geisslinger, G., Bang, H., and Brune, K. (1997) *J. Clin. Immunol.* **17**, 380–386
56. De Ceuninck, F., Allain, F., Caliez, A., Spik, G., and Vanhoutte, P. M. (2003) *Arthritis Rheum.* **48**, 2197–2206