



**HAL**  
open science

# LES HEPARANES SULFATES: des ligands cellulaires et matricielles pour les cytokines

Hugues Lortat-Jacob

► **To cite this version:**

Hugues Lortat-Jacob. LES HEPARANES SULFATES: des ligands cellulaires et matricielles pour les cytokines. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Joseph Fourier (Grenoble 1), 1998. tel-03394426

**HAL Id: tel-03394426**

**<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-03394426>**

Submitted on 22 Oct 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Mémoire en vue de la demande d'habilitation  
à diriger des recherches**

**LES HEPARANES SULFATES: des ligands cellulaires et matricielles pour les cytokines**

Dr. Hugues Lortat-Jacob

Université Joseph Fourier  
Domaine universitaire de Grenoble  
B.P. 53 - 38041 Grenoble cedex 09

Soutenu le 23 novembre 1998 devant la commission d'examen:

Dr. Fernando Arenzana-Seisdedos  
Pr. Marc Block  
Pr. Bernard Pau  
Dr. Maurice Petitou  
Pr. Michel Van Der Rest

Oui, ne penses-tu pas, ô Sage que tu es, que notre connaissance de quelque chose que ce soit est imparfaite si elle se réduit à la notion exacte de cette chose...?

(Dialogue de l'arbre. P. Valéry)

Nous savons, d'ailleurs, que mille choses sont nécessaires dans le voisinage de ces êtres, pour qu'ils soient.

(Eupalinos ou l'Architecte P. Valéry).

A Anne.  
A Claire, Géraud, Alix et Jeanne.  
A mes parents.  
A ceux dont le travail est aussi ici.

**SOMMAIRE**

<b>I. CURRICULUM VITAE</b>	<b>2</b>
<b>II. RESUME DES ACTIVITES DE RECHERCHE</b>	<b>4</b>
<b>III. PUBLICATIONS RECENTES</b>	<b>6</b>
<b>IV. ACTIVITES D'ENCADREMENT</b>	<b>7</b>
<b>V. CONTRATS DE RECHERCHE</b>	<b>9</b>
<b>VI. COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES</b>	<b>10</b>
<b>VII. ACTIVITES DE RECHERCHE</b>	<b>11</b>
<b>VIII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>26</b>
<b>IX. INVITATIONS A DES SEMINAIRES ET A DES CONGRES</b>	<b>29</b>
<b>X. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b>	<b>31</b>

---

## I. CURRICULUM VITAE

---

### ETAT CIVIL

*Nom:* **Hugues LORTAT-JACOB**

*Date de naissance:* 3 Janvier 1961

*Situation de famille:* Marié, 4 enfants

*Adresse personnelle:* 105 chemin crêt de chaume  
38330 S<sup>t</sup> Ismier

*Adresse professionnelle:* Institut de Biologie Structurale  
CNRS UPR 9015  
41, avenue des martyrs  
38027 Grenoble cedex 01  
Tel: 04.76 88 95 69, Fax: 04.76 88 54 94

### CURSUS UNIVERSITAIRE

1988-1991 **DOCTORAT** (mention très honorable)  
UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE  
INSTITUT PASTEUR DE LYON - CNRS URA 602

1987-1988 **D.E.A.** de Génie Enzymatique, Bioconversion et Microbiologie  
UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE  
ROUSSEL UCLAF

1985-1987            **DIPLOME D'INGENIEUR** en Génie Biologique  
UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

1983-1984            **MAITRISE** de Biochimie (Mention Bien)  
UNIVERSITE D'ORSAY (Paris XI)

1982-1983            **LICENCE** de Biochimie (Mention Bien)  
UNIVERSITE D'ORSAY (Paris XI)

1980-1982            **D.E.U.G. B** (Mention Assez Bien)  
UNIVERSITE DE SAVOIE (Chambéry)

#### **CURSUS PROFESSIONNEL**

1988                    Ingénieur, en poste chez Roussel Uclaf, centre de Romainville

1991                    Chargé de recherche 2<sup>ème</sup> classe, CNRS, en poste à l'institut Pasteur de  
Lyon, CNRS URA 1459.

1995                    Chargé de recherche 1<sup>ère</sup> classe, CNRS, en poste à l'institut Pasteur de  
Lyon, CNRS URA 1459, puis à partir de mai 1997 à l'Institut de Biologie  
Structurale, CNRS UPR 9015 - Grenoble.

---

## II. RESUME DES ACTIVITES DE RECHERCHE

---

### I. PERIODE PRE-DOCTORALE

Au cours d'une période d'un an (1988-1989), en tant qu'ingénieur dans les laboratoires Roussel Uclaf, j'ai pu mettre au point une nouvelle méthode de purification d'un facteur de coagulation (la thrombine) par des techniques de chromatographie. Commercialisée depuis 1947, cette protéine était alors préparée par des méthodes de précipitations acides et alcooliques longues et lourdes à mettre en oeuvre. Le protocole développé (deux étapes de chromatographie d'échange d'ions, et une de gel filtration) a permis l'obtention de la thrombine en trois jours (contre trois semaines) avec un bon degré de pureté. Un pilote de production de petite taille a pu être mis en place au cours de ce projet. Cette première expérience professionnelle, qui a également constitué mon stage de DEA, m'a permis d'acquérir les techniques classiques de biochimie, et une connaissance du milieu industriel.

Les contacts noués pendant cette période ont permis par la suite la mise en place d'un projet de recherche, centrée sur l'étude de l'interféron-gamma (IFN $\gamma$ ), ce qui a constitué mon sujet de thèse.

### II. PERIODE DOCTORALE

Le sujet développé au cours de ma thèse concernait l'étude des interactions cytokines-matrice extracellulaire. Au cours de cette période de deux ans et demi (octobre 1989 - avril 1991) nous avons démontré l'existence d'une interaction entre l'IFN $\gamma$  et une matrice extracellulaire de type membrane basale (matrigel), caractérisée par une affinité importante ( $K_d = 1,5$  nM). Le rôle possible de cette interaction pouvait être de concentrer localement l'IFN $\gamma$ , ce qui rendait compte de l'effet généralement paracrine de cette cytokine. Ces premiers résultats ont permis de proposer la notion de "récepteurs matriciel" des cytokines et ont mis ainsi en évidence le rôle modulateur de la

matrice extracellulaire dans la réponse cellulaire à l'IFN $\gamma$ . Ce "récepteur matriciel" est constitué par les chaînes oligosaccharidiques d'un protéoglycane à héparane sulfate, le perlecan. Enfin, nous avons également déterminé que les sites d'interactions se situaient dans l'extrémité C-terminale de l'IFN $\gamma$ . L'ensemble de ces travaux a donné lieu à 6 publications (1,2,3,4,5,7, voir page 31)

### III. PERIODE POST-DOCTORALE

J'ai été recruté au CNRS, en octobre 1991, dans l'URA 1459 de l'institut Pasteur de Lyon, avec pour projet la poursuite de l'étude des interactions cytokines/héparane sulfate.

Jusqu'en 1997, date de mon départ de l'institut Pasteur de Lyon pour l'institut de biologie structurale de Grenoble, nous avons analysé le rôle fonctionnel de cette interaction, à la fois *in vitro* et *in vivo*. En particulier nous avons pu démontrer que les molécules d'héparane sulfate contrôlaient d'une part, la distribution tissulaire de la cytokine, et, d'autre part son activité spécifique (activité anti virale), par un mécanisme original, qui implique une protéolyse limitée du domaine C-terminal de la cytokine. L'acquisition d'un système d'analyse d'interactions en temps réel (Biacore) nous a permis ensuite d'étudier les aspects dynamiques de la formation des complexes IFN $\gamma$ /héparane sulfate et IFN $\gamma$ /récepteur cellulaire. L'ensemble de ces travaux (publications 14 à 22) a permis de démontrer que le signal biologique délivré par une cytokine ne dépendait pas exclusivement de son niveau d'expression, ou du niveau d'expression de son récepteur, mais que le "contexte cellulaire", en particulier les protéoglycanes de la matrice extracellulaire, pouvait jouer un rôle important dans les processus de communications entre cellules.

A l'institut de biologie structurale de Grenoble, où j'ai été accueilli par le groupe de virologie, j'ai pu m'initier à différentes techniques de biologie moléculaire (clonage du récepteur primaire de l'adénovirus de type 2 dans un vecteur d'expression pour le système baculovirus/cellule d'insecte). J'ai également poursuivi l'étude, notamment dynamique, des interactions IFN $\gamma$ /récepteur, et IFN $\gamma$ /héparane sulfate, et proposé un modèle cinétique des interactions que la cytokine contracte dans l'espace extracellulaire avant de stimuler une cellule cible (articles 23-25). Enfin, j'ai pu travailler à la constitution d'un projet de recherche centré sur le rôle des héparanes sulfates au cours de l'infection virale et de la réaction inflammatoire viro-induite. Ces derniers aspects seront présentés brièvement en perspective (voir § VIII, page 26).



---

### III. PUBLICATIONS RECENTES (1995-1998)

liste complète des publications page 31

---

**Lortat-Jacob H.** *Brevet n° 95.08723* déposé en France, le 19/07/95.

**Lortat-Jacob, H.,** Turnbull, J.E., and Grimaud J.A. *Biochem. J.* 310, 497-505 (1995).

Praillet C., **Lortat-Jacob H.**, and Grimaud J.A. *FEBS lett.* 387, 109-112 (1996).

Praillet C., **Lortat-Jacob H.**, and Grimaud J.A. *Biochem. J.* 318, 863-870 (1996).

**Lortat-Jacob H.**, Brisson C., Guerret S. and Morel G. *Cytokine* 8, 557-566 (1996).

**Lortat-Jacob H.**, Baltzer F., and Grimaud J.A. *J. Biol. Chem.* 271, 16139-16143 (1996).

**Lortat-Jacob H.**, Baltzer, F., Desmoulière A., Peyrol S., and Grimaud J.A. *J. Hepatol.* 26, 894-903 (1997).

**Lortat-Jacob H.**, Garonne P., Banchereau J. and Grimaud J.A. *Cytokine* 9, 101-105 (1997).

Sadir, R., Forest E., and **Lortat-Jacob, H.** *J. Biol. Chem.* 273, 10919-10925 (1998).

---

## IV. ACTIVITES D'ENCADREMENT

---

### I. Personnels techniques

Sous la direction de Monsieur Guy Thomas (Usiphar/Roussel Uclaf), j'ai participé à l'encadrement et à la formation du personnel de production des produits dérivés de la thrombine.

Sous la direction de Monsieur Jean-Alexis Grimaud (Institut Pasteur de Lyon -IPL - CNRS URA 1459), j'ai encadré des techniciens IPL (Mademoiselle Agnès Maleki, 1995-1996), et CNRS (Madame Colette Rousset, 1996-1997)

### II. Etudiants de 3<sup>ème</sup> cycle

A l'institut Pasteur de Lyon

- 1991-1992    Mademoiselle Isabelle Roche. DEA de Biologie Cutanée Cosmétologie.  
Co-encadrement avec le laboratoire de recherche dermatologique et immunologique, sous la direction du Dr. Daniel Schmitt, INSERM U 346.  
*Interaction Kératinocyte-Membranes basales.*
- 1992-1993    Mademoiselle Christel Normand. DEA de Différentiation, Génétique et Immunologie.  
*Les protéoglycanes à héparanes sulfates, réservoirs et cibles de cytokines.*
- 1993-1996    Madame Christel Praillet. Thèse de doctorat.  
*Modulation des glycosaminoglycanes in vitro et in vivo par l'interféron- $\gamma$ .*

Depuis 1995 Mademoiselle Rabia Sadir. Thèse de doctorat.

Co-encadrement avec l'UMR CNRS 5578, Dr. Gérard Morel.

*Dynamique de l'interaction IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R, et internalisation des complexes ligands/récepteurs.*

A l'institut de Biologie Structurale de Grenoble:

Depuis 1998 Monsieur Emmanuel Quevillon. DEA de biologie cellulaire et moléculaire.

*Criblage et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la base du penton de l'adénovirus de sérotype III.*

---

## V. CONTRATS DE RECHERCHE

---

Le financement des travaux décrit ci-dessous a été en partie réalisé par des contrats de recherche obtenus en réponse aux appels d'offre suivants:

- |            |   |
|------------|---|
| Avril 1995 | Association pour la Recherche sur le Cancer (200000 F)<br><i>Rôle des interactions cytokines-matrice extracellulaire</i>  |
| Juin 1996  | Conseil régional/Région Rhone-Alpes. Programme Emergence (120000 F)<br><i>Modélisation d'analogues structuraux de l'héparane sulfate possédant une forte affinité pour l'interféron-<math>\gamma</math></i> |

---

## VI. COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES

---

Dr. Hynda Kleinman, Laboratory of Developmental Biology and Anomalies, NIH, Bethesda MD, USA.

*Préparation et purification d'extraits de membrane basale (travail publié).*

Pr. John Gallagher, Department of Medical Oncology, Paterson Institute, Christie Hospital, University of Manchester, Manchester, UK.

*Caractérisation structurale des héparanes sulfates (travail publié).*

Dr. Jacques Banchereau, Schering-Plough, Laboratoire d'immunologie, Dardilly.

*Interaction IL-4/glycosaminoglycanes (travail publié).*

Dr. Sergey Tatkov, State research, Center of virology and biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russie.

*Interaction IFN $\gamma$ /héparine.*

Dr. Laurence Ozmen, Hoffmann la Roche, Research center, Basel, Switzerland.

*Interaction IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R. (travail publié).*

Pr. André Lubineau, Laboratoire de Chimie Organique Multifonctionnelle, Institut de Chimie Moléculaire d'Orsay, Université de Paris Sud, Orsay.

*Obtention par synthèse chimique d'analogues structuraux de l'héparane sulfate.*

Dr. Anne Imberty, CERMAV-CNRS, Université de Grenoble.

*Modélisation des complexes héparane sulfate/Interféron- $\gamma$ .*

Pr. Emmanuel Drouet, Département de microbiologie, Université de Pharmacie de Grenoble.

*Récepteur viraux et héparane sulfate.*

Dr. Howard Jonson, Department of microbiology and cell science, University of Florida, USA.

*Analyse de l'interaction IFN $\gamma$ /domaine intracytoplasmique du récepteur de l'IFN $\gamma$ .*

Dr. Fernando Aranzana-Seisdedos, Unité d'immunologie virale, Institut Pasteur, Paris.

*Importance des héparanes sulfates pour l'activité anti V.I.H. de SDF-1.*

---

## VII. ACTIVITES DE RECHERCHE

---

### I. POSITION DU SUJET

L'environnement péricellulaire est composé d'une phase soluble, qui contient notamment des effecteurs moléculaires comme des hormones des facteurs de croissance ou des cytokines, et d'une phase solide: la matrice extracellulaire. Ces deux systèmes, informatifs pour les cellules, sont reconnus par un ensemble de protéines transmembranaires, par exemple les récepteurs des cytokines ou les intégrines.

De part sa nature insoluble, la matrice extracellulaire agit localement, et constitue une stimulation continue des cellules qui sont à son contact. A l'inverse, il est communément admis que les effecteurs moléculaires, comme les cytokines, diffusent librement dans l'espace extracellulaire, pour interagir avec des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules. Ce système permet donc une stimulation à distance des cellules cibles, mais de façon ponctuelle. Toute-fois, pour les cytokines et certains facteurs de croissance, ce mode de communication ne rend pas compte de l'activité généralement très localisée de ces molécules (activité paracrine, voir autocrine). De plus, les cytokines sont des facteurs à activités multiples, et les mécanismes qui spécifient la réponse cellulaire à de tels facteurs restent mal connus.

Des travaux récents montrent néanmoins que le "contexe cellulaire", notamment celui généré par la matrice extracellulaire peut déterminer la spécificité de la réponse cellulaire. Par exemple, la transition phénotypique fibroblaste-myofibroblaste induite par le TGF $\beta$  n'est possible que si les cellules cibles adhèrent à un substrat contenant de la fibronectine (Serini *et al.* 1998). Enfin, l'interaction directe d'une cytokine avec un composé de la matrice extracellulaire permet l'immobilisation, et donc la localisation, de ce facteur.

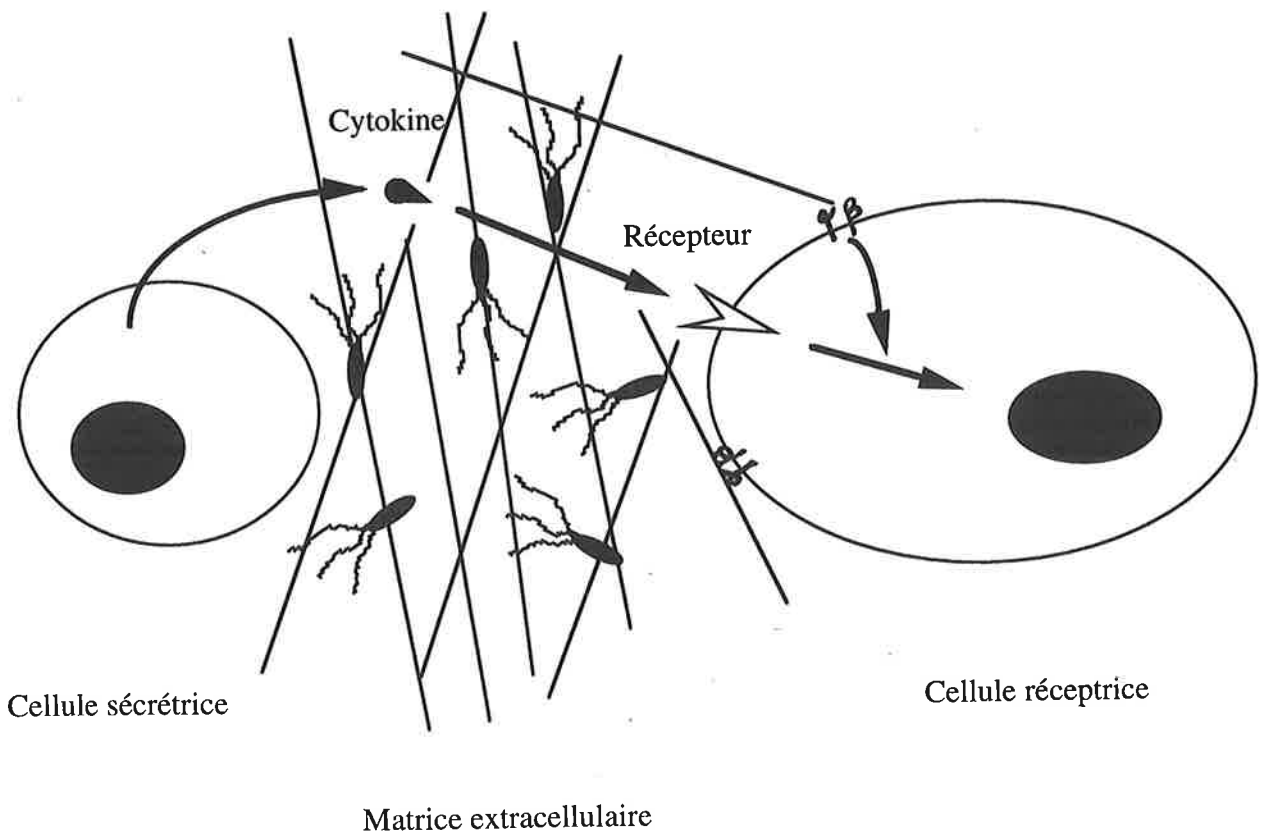
Ainsi, dans les processus de communication cellulaire, il existe une coopération étroite entre les effecteurs moléculaires solubles et la matrice extracellulaire pour délivrer à une cellule cible un stimulus spécifique et localisé.

# PLANCHE I

## Espace péricellulaire:

Une phase solide:  
La matrice extracellulaire

Une phase soluble:  
Des facteurs de croissance  
Des cytokines  
Des hormones ...etc



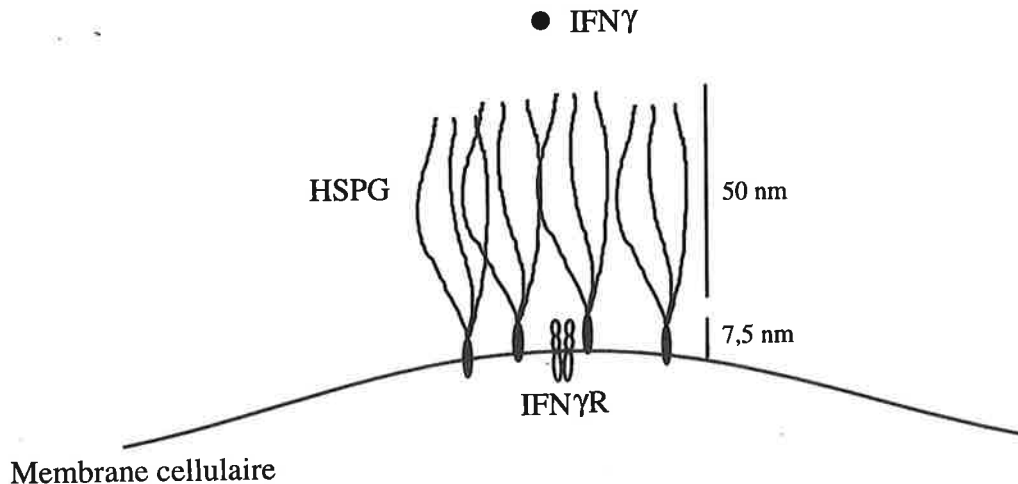
Les cellules communiquent entre elles par le biais d'effecteurs moléculaires solubles (cytokines, facteurs de croissances, ...etc) qui diffusent dans l'espace extracellulaire pour atteindre leurs cellules cibles. La réponse cellulaire dépend de la liaison cytokine-récepteur, mais aussi des différentes interactions que peut éventuellement contracter la cytokine avec les molécules de la matrice extracellulaire.

## PLANCHE II

### LES DEUX LIGANDS DE L'IFN $\gamma$ :

<b>Récepteur cellulaire.</b> Une protéine transmembranaire:	IFN $\gamma$ R $\alpha$
Masse moléculaire:	90 kDa
Nombre par cellule:	500 à 10000
Affinité pour l'IFN $\gamma$ :	Kd # $10^{-9}$ à $10^{-10}$ M

<b>Héparanes sulfates.</b> Présents sur différentes protéines membranaire (Syndécan, Glypican), ou matricielles (Pearlecan, Agrin)	
Masse moléculaire:	15 à 70 kDa
Nombre par cellule:	$10^5$ à $10^6$
Affinité pour l'IFN $\gamma$ :	Kd # $10^{-9}$ M



Une cellule typique a à sa surface 500 à 10000 molécules d'IFN $\gamma$ R $\alpha$ , et  $10^5$  à  $10^6$  molécules d'héparanes sulfates. Pour une masse moléculaire moyenne de 30 kDa, une molécule d'héparane sulfate mesure environ 50 nm. Une cellule ayant  $10^5$  héparanes sulfates répartis de façon uniforme sur sa surface est entièrement recouverte par ces molécules (Yanagishita and Hascall 1992). Les deux ligands de l'IFN $\gamma$ , diffèrent donc de façon importante pour leur taille, leur densité et leur accessibilité.



C'est notamment le cas de l'IFN $\gamma$  qui se lie avec une forte affinité ( $K_d \approx 1,5$  nM) aux chaînes oligosaccharidiques du perlecan, un protéoglycane à héparane sulfate des membranes basales.

Deux ligands au moins de l'IFN $\gamma$  sont donc connus :

- \* Un récepteur spécifique transmembranaire (IFN $\gamma$ R), dont le rôle est d'initier, dans la cellule, une cascade de phosphorylations, typique de la transmission du signal.
- \* Des protéoglycanes à héparane sulfate dont le rôle est décrit dans ce mémoire.

Dans cette partie du document seront présentés :

- (i) La caractérisation des interactions de l'IFN $\gamma$  avec ses ligands: les protéoglycanes à héparane sulfate et le récepteur cellulaire.
- (ii) Le rôle fonctionnel des interactions IFN $\gamma$ /héparane sulfate.
- (iii) Un modèle dynamique de la communication cellulaire par l'IFN $\gamma$ .

## II. L'INTERFERON $\gamma$ ET SES LIGANDS: IFN $\gamma$ R ET HEPARANE SULFATE

### L'interféron $\gamma$

L'interféron- $\gamma$  est un polypeptide de 143 acides aminés, d'abord caractérisé sur la base de son activité antivirale. Il est essentiellement sécrété par les lymphocytes T, et intervient au cours de l'inflammation et pratiquement à tous les stades de la réponse immunitaire (activation des macrophages, expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité, augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup>, modulation de la balance lymphocytaire Th1/Th2, modulation de la réponse lymphocytaire B...). L'IFN $\gamma$  est aussi cytotatique, et participe à la régulation d'un grand nombre de molécules d'adhésion (ICAM-1...), et des composés de la matrice extracellulaire (certains collagènes, fibronectine, laminine, protéoglycanes...). L'IFN $\gamma$  joue donc un rôle important dans les mécanismes de défense, dans la croissance et la différenciation de certaines populations cellulaires, dans les phénomènes d'adhésion et de reconnaissance (Billiau 1996).

Ces activités extrêmement variées (l'expression d'au moins 200 gènes est régulée par l'IFN $\gamma$  (Boehm *et al.* 1997)), observées *in vitro*, ont donné lieu à de nombreux essais cliniques, dans des

pathologies diverses, néanmoins, l'efficacité clinique de l'IFN $\gamma$  n'a pas été clairement démontrée jusqu'à présent, et son indication principale reste limitée à la granulomatose chronique (Todd and Goa 1992).

L'IFN $\gamma$  exerce son activité via un récepteur transmembranaire, qui a été trouvé à la surface de toutes les cellules étudiées jusqu'à présent (Van Loon, A.P.G.M. *et al.* 1991), et qui est largement distribué dans la majorité des tissus (Valente, G. *et al.* 1993). Ce récepteur fait partie de la super famille des récepteurs des cytokines qui possèdent un seul domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire, composé de deux domaines de type immunoglobuline et un domaine intracellulaire dépourvu d'activité thyrosine kinase (Aguet *et al.* 1988). Cette protéine, ou IFN $\gamma$ R $\alpha$  interagit avec une seconde chaîne polypeptidique transmembranaire, ou IFN $\gamma$ R $\beta$ . Cette seconde protéine ne lie pas l'IFN $\gamma$  mais est nécessaire à la transmission du signal induite par la cytokine (Hemmi *et al.* 1994). L'interaction IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R déclenche dans la cellule une cascade de phosphorylations, qui implique des Janus kinases (JAK-1 et -2) et la protéine STAT-1 (Sakatsume *et al.* 1995). Le complexe IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R est ensuite internalisé, et pourrait migrer vers le noyau (voir aussi page 14). La base structurale de l'activité de l'IFN $\gamma$  est encore sujette à débat. Des études avec des peptides synthétiques, des anticorps monoclonaux ou des digestions limitées de la cytokine ont clairement établi que la partie N-terminale était essentielle à l'intégrité structurale de l'IFN $\gamma$ , et intervenait directement dans l'interaction avec son récepteur. En revanche, de nombreuses études menées sur l'extrémité C-terminale de la cytokine n'ont pas donné une image claire des relations structures-fonctions de cette partie de la molécule (Lundell and Narula 1994). En particulier, l'IFN $\gamma$  est une population hétérogène de molécules dont le dernier acide aminé, coté C-terminal, peut être n'importe lequel entre les position 124 et 143. La structure tri-dimensionnelle du complexe IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R $\alpha$ , déterminée récemment, ne montre pas de contact particulier entre l'extrémité C-terminale de la cytokine et le récepteur (Walter *et al.* 1995). Néanmoins, cette extrémité est clairement impliquée dans l'activité biologique de la cytokine.

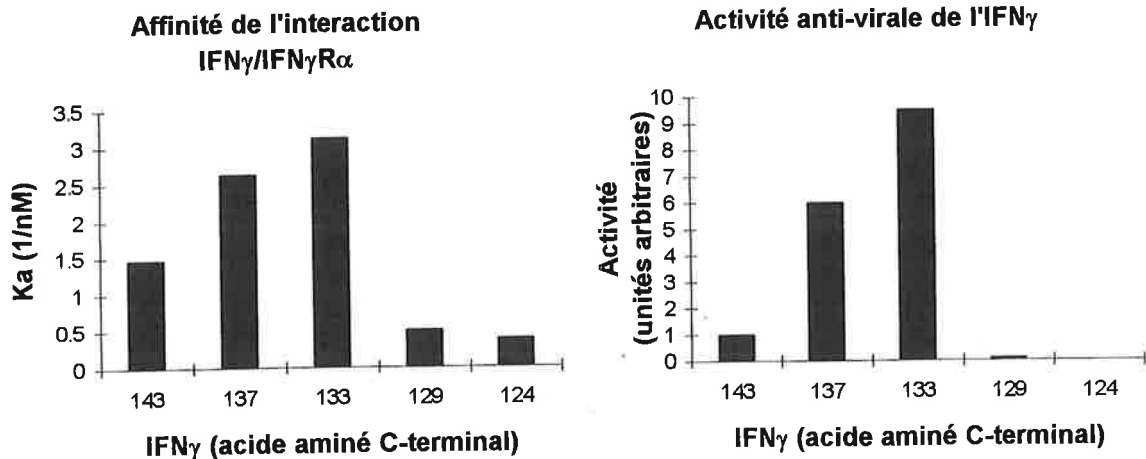
L'utilisation d'enzymes, dans des conditions bien définies permet de protéolyser spécifiquement l'extrémité C-terminale de l'IFN $\gamma$ . Nous avons ainsi préparé et caractérisé par spectrométrie de masse (électronébulisation) une série de molécules dont les 6, 10, 14, ou 19 derniers acides aminés ont été enlevés. Ces molécules appelées IFN $\gamma$ <sub>137</sub>, IFN $\gamma$ <sub>133</sub>, IFN $\gamma$ <sub>129</sub>, et IFN $\gamma$ <sub>124</sub>, ont été utilisées pour étudier la fonction du domaine C-terminal de la molécule, en particulier celle des séquences 125-131 et 137-140.

## PLANCHE III

### Extrémité C-terminale de l'IFN $\gamma$ humain (domaine 124-143).

C1	C2		
... <u>AKTGKRKRSQ</u> MLFR <u>GRR</u> ASQ	IFN $\gamma_{143}$	(-)	
... <u>AKTGKRKRSQ</u> MLFR	IFN $\gamma_{137}$	(aFx)	
... <u>AKTGKRKRSQ</u>	IFN $\gamma_{133}$	(Cy)	
... <u>AKTGKR</u>	IFN $\gamma_{129}$	(Arg-C)	
... A	IFN $\gamma_{124}$	(-)	

L'IFN $\gamma$  entier (IFN $\gamma_{143}$ ) a été protéolysé par le facteur X activé, la carboxypeptidase Y, ou l'endoprotéinase Arg-C, et analysé par spectrométrie de masse. Ces trois digestions permettent de préparer de l'IFN $\gamma_{137}$ , de l'IFN $\gamma_{133}$ , et de l'IFN $\gamma_{129}$ . L'IFN $\gamma_{124}$  est produit par expression du gène tronqué. Les deux régions basiques de la molécule (région C1: 125-131 et région C2: 137-140) sont soulignées.



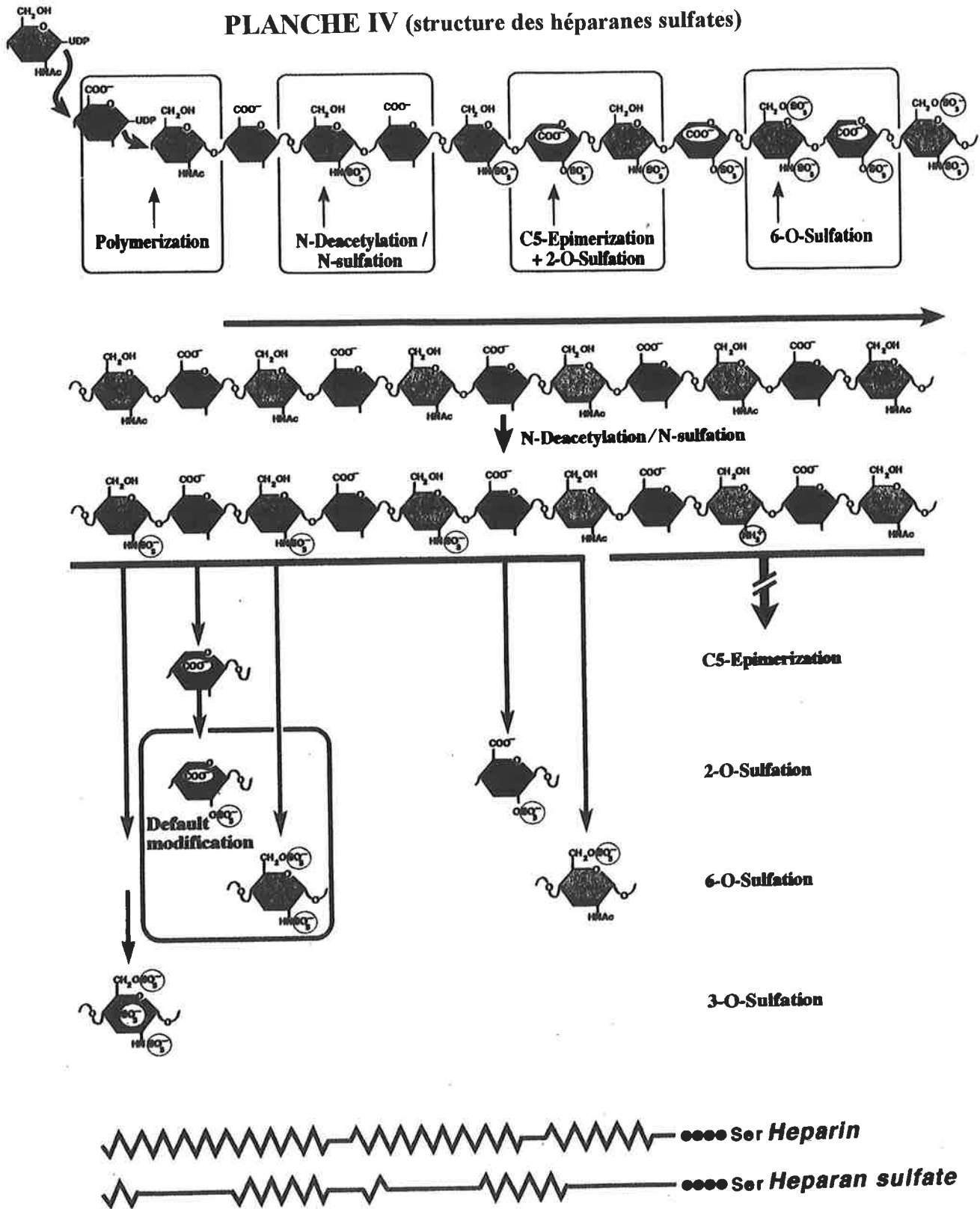
L'affinité IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R $\alpha$  a été mesurée par SPR (Biacore). L'activité antivirale correspond à la capacité de l'IFN $\gamma$ , à protéger des cellules Wish en culture, de la lyse cellulaire induite par le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV). Toutes les coupures en aval du domaine C1 augmentent l'affinité de l'IFN $\gamma$  pour son récepteur, ainsi que l'activité biologique de la cytokine. Toutes les coupures dans ou en amont de C1 ont l'effet inverse. Les IFN $\gamma_{129}$  et IFN $\gamma_{124}$  bien que dépourvus d'activité biologique ont toujours une affinité substantielle pour le récepteur.

*\*L'affinité de l'interaction IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R dépend de l'intégrité du domaine C-terminal de l'IFN $\gamma$*

Pour cette étude, la partie extracellulaire du récepteur (IFN $\gamma$ R $\alpha$ ) a été immobilisée à la surface d'un biocapteur, et les interactions de différents IFN $\gamma$  ont été analysées (technologie Biacore). A la surface du biocapteur, l'IFN $\gamma$  se lie à son récepteur avec une affinité de 0,68 nM, et induit la dimérisation de celui-ci. Ce système reproduit donc fidèlement les événements d'interactions et de dimérisations observés à la surface de cellules en culture (Greenlund *et al.* 1993). L'utilisation d'anticorps monoclonaux, dirigés contre différents domaines C-terminaux de la cytokine a permis de montrer que la région 125-131 était enfouie dans le complexe IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R, mais pas les régions situées en aval de cette séquence (domaine 132-143). Nous avons pu également observer que tous les clivages de la molécule en aval de la région 125-131 (IFN $\gamma$ <sub>137</sub> et IFN $\gamma$ <sub>133</sub>) augmentaient l'affinité de l'interaction, et l'activité biologique de la cytokine, alors que les clivages dans, ou en amont, de cette région avaient l'effet inverse. L'étendue des coupures de cette région (IFN $\gamma$ <sub>129</sub> et IFN $\gamma$ <sub>124</sub>) de la molécule permet donc de moduler l'activité biologique de l'IFN $\gamma$ , et suggère ainsi un mécanisme de régulation de la cytokine (article 25). De manière inattendue, l'IFN $\gamma$ <sub>124</sub>, qui est pratiquement dépourvu d'activité biologique, fixe toujours son récepteur, avec une affinité néanmoins réduite. Il a été proposé récemment (Johnson *et al.* 1998) que la région 125-131 de l'IFN $\gamma$  pourrait se lier à un domaine intracytoplasmique du récepteur, après internalisation du complexe IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R, et que cette liaison était indispensable à la translocation nucléaire de l'IFN $\gamma$ , accompagné par les protéines JAK-1, JAK-2, et STAT-1. Ainsi, l'IFN $\gamma$ <sub>124</sub>, pourrait se fixer à son récepteur, mais serait inopérant dans la translocation nucléaire des protéines impliquées dans la transmission du signal. Nous avons projeté une collaboration avec le Dr. Johnson de l'université de Floride pour étudier l'existence d'un tel mécanisme.

De façon remarquable, nous avons également observé que l'IFN $\gamma$  ne pouvait pas se fixer simultanément à son récepteur et aux molécules d'héparanes sulfates. Ce résultat est important car il distingue l'IFN $\gamma$  des autres molécules actuellement étudiées pour leur interaction avec les héparanes sulfates, notamment les facteurs de croissance. En effet, l'interaction FGF/récepteur cellulaire a pour pré-requis la formation d'un complexe FGF/héparane sulfate. C'est donc un complexe tri-moléculaire, formé du facteur de croissance, de son récepteur et d'héparane sulfate qui permet la transmission du signal (DiGabriele *et al.* 1998). Cette différence entre FGF et IFN $\gamma$  a permis de proposer l'existence d'une nouvelle classe de mécanisme de régulation de l'activité d'une cytokine par les héparanes sulfates (voir page 19, et article 25).

## PLANCHE IV (structure des héparanes sulfates)



Les héparanes sulfates sont des polymères oligosaccharidiques dont l'unité de base est un disaccharide composé d'une glucosamine N-acétylée (en gris), et d'un acide glucuronique (en noir). En cours de synthèse, la chaîne subit une série de modifications, dont la première (N-déacétylation/N-sulfatation des glucosamines) représente une étape clé. En effet, les régions qui restent N-acétylées échappent généralement aux modifications ultérieures (épimérisation des acides glucuroniques, différentes O-sulfatation). Ces dernières génèrent une grande hétérogénéité structurale dans le polymère d'héparane sulfate. Ces molécules sont donc constituées de domaines N-acétylés et faiblement modifiés (trait) alternant avec des domaines N-sulfatés (zig-zag). A l'inverse, dans le polymère d'héparine une large majorité des glucosamines sont N-sulfatées, et le polymère est donc largement modifié de façon relativement plus homogène. D'après Salmivirta *et al.* 1996.

*\* L'interaction IFN $\gamma$ /héparane sulfate, vue par l'héparane sulfate*

L'IFN $\gamma$  humain possède trois courtes séquences enrichies en acides aminés basiques (Rinderknecht *et al.* 1984), typiques des domaines d'interaction avec les héparanes sulfates (Hileman *et al.* 1998). Il s'agit des domaines 86-89 (KKKR), 125-131 (KTGKRKR) et 137-140 (RGRR). Nous avons étudié le rôle de ces régions de la molécule pour l'interaction avec les héparanes sulfates et observé que l'activité de liaison se situait exclusivement dans l'extrémité C-terminale de la cytokine (région 124-143). A l'équilibre, c'est la séquence 125-131 qui est principalement impliquée dans le complexe IFN $\gamma$ /HS. Rappelons que ce domaine est précisément celui qui accroît l'affinité de l'interaction IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R, et ces données sont donc cohérentes avec l'impossibilité qu'a l'IFN $\gamma$  de se lier simultanément à son propre récepteur et aux héparanes sulfates. La forme active de l'IFN $\gamma$  est un homodimère, et nous avons pu montrer par des expériences de pontages croisés (cross-link) qu'une molécule d'héparane sulfate interagit avec les deux domaines C-terminaux d'un dimère d'IFN $\gamma$  (article 14).

### **Structure des héparanes sulfates**

Les héparanes sulfates, comme tous les glycosaminoglycanes, sont des polymères oligosaccharidiques dont l'unité de base est un disaccharide. Pour les héparanes sulfates, ce disaccharide est composé d'une glucosamine (quelques fois non substituée, et majoritairement N-acétylée ou N-sulfatée) et d'un acide uronique (acide D-glucuronique, ou son épimère en C5: acide D-iduronique). En outre, différents O-sulfates (principalement en position 6 sur la glucosamine, et en position 2 sur l'acide iduronique) permettent de construire théoriquement une vingtaine de disaccharides différents dont 10 ont été effectivement identifiés (Hardingham and Fosang 1992). Une chaîne d'héparane sulfate pouvant être constituée de plus de 100 disaccharides, une très grande hétérogénéité de structures peut être générée par le jeu de ces différentes combinaisons des 10 disaccharides de bases. En réalité, toutes les combinaisons ne sont pas possibles, et on sait que les groupes O-sulfates et les acides iduroniques sont habituellement confinés dans des régions riches en glucosamine N-sulfatées, dites régions de type héparine, alors que les régions riches en glucosamine N-acétylées sont peu sulfatées et contiennent surtout des acides glucuroniques. Une molécule d'héparane sulfate est donc une succession de domaines structuraux, caractérisés par un enrichissement en glucosamines N-sulfatées, ou en glucosamines N-acétylées (Hardingham and

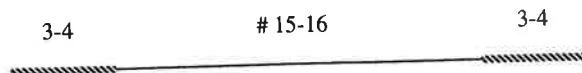
Fosang 1992; Salmivirta *et al.* 1996). Au sein de ces différents domaines, le degré de polymérisation, le degré d'épimérisation des acides glucuroniques, ainsi que le profil de sulfatation, confèrent aux héparanes sulfates une hétérogénéité structurale presque infinie. Cette diversité leur permet d'exercer un éventail de fonctions très larges, essentiellement par le biais d'interactions directes avec de nombreuses protéines (Spillman and Lindahl 1994; Conrad 1997). De plus, les acides iduroniques caractérisés par une grande flexibilité conformationnelle pourraient permettre aux héparanes sulfates d'adapter leurs structures à un éventuel ligand (Casu *et al.* 1988; Venkataraman *et al.* 1994). De nombreux travaux actuels suggèrent qu'à chacun de ces domaines structuraux des héparanes sulfates, pourrait correspondre des domaines fonctionnels de la molécules.

Enfin, les cellules peuvent modifier la séquence oligosaccharidique des héparanes sulfates (ou des autres glycosaminoglycanes) qu'elles synthétisent en fonction de leur état (différentiation, prolifération...etc) ou des stimuli qu'elles reçoivent. Ceci ajoute encore à la diversité et la flexibilité structurale de ces molécules (Esko 1991; Iozzo and Murdoch 1996). Cet aspect de la biologie des glycosaminoglycanes a été abordé au laboratoire par Christel Praillet, étudiante en thèse, qui a montré que la structure des héparanes sulfates et des dermatanes sulfates synthétisés par des fibroblastes de peau humaine en culture était modifiée par l'action de certaines cytokines. Ces modifications structurales engendrent des modifications fonctionnelles des glycosaminoglycanes. Ce travail, qui a été publié (articles 15-17), n'est pas détaillé ici.

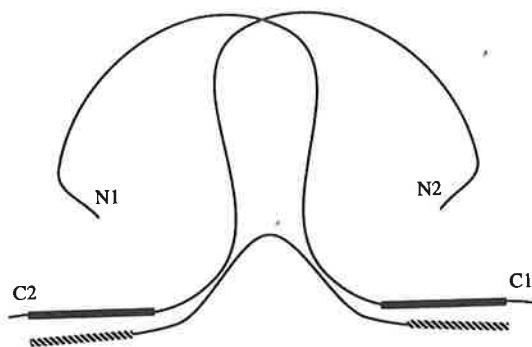
La notion de spécificité des interactions protéines/glycosaminoglycanes est un problème important, non encore résolu pour de nombreuses protéines. Il n'existe pas encore de méthodes générales pour séquencer les héparanes sulfates, mais l'utilisation d'agents de clivage chimique (Cifonelli 1968) ou enzymatique (Ernst *et al.* 1995), de spécificité connue permet néanmoins de définir différents domaines structuraux de ces molécules, et leur participation à une activité biologique. De fait seules quelques structures, spécifiques d'une protéine, ont été complètement caractérisées. Il s'agit essentiellement d'un pentasaccharide, liant l'antithrombine III (Choay *et al.* 1981; Petitou *et al.* 1988), et, dans une moindre mesure, d'un décasaccharide spécifique du facteur de croissance FGF-2 (Turnbull *et al.* 1992; Guimond *et al.* 1993). Les molécules d'héparanes sulfates sont liées à diverses protéines pour former les protéoglycanes, qui sont des constituants ubiquitaires des matrices extracellulaires (Iozzo 1998), mais aussi de la membrane cellulaire (David 1993). Cette double localisation, associée à leur grande hétérogénéité structurale en font des molécules stratégiquement positionnées pour interagir avec un grand nombre de composés.

# PLANCHE V

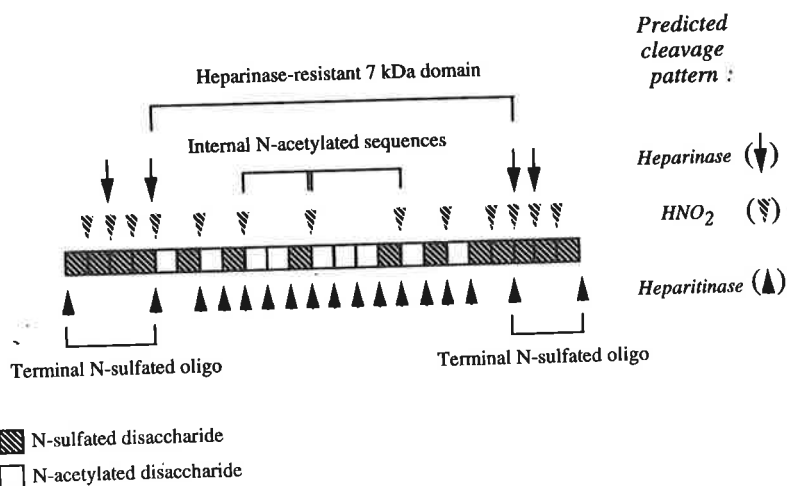
(a)



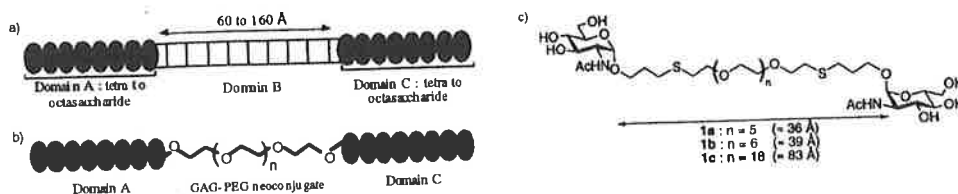
(b)



(c)



La structure du site que reconnaît l'IFN $\gamma$  sur l'héparane sulfate (a) est constituée de deux oligosaccharides terminaux dont les glucosamines sont N-sulfatées, reliés entre eux par un domaine de 15 à 16 disaccharides de séquence différente. Les deux domaines terminaux interagissent directement avec les deux extrémités C-terminales d'un dimère d'IFN $\gamma$ , la partie interne formant un pont entre les deux monomères de la cytokine (b). Le profil de dépolymérisation de la molécule par l'acide nitreux, l'héparinase ou l'héparitinase est indiqué (c). Ces profils montrent que dans les séquences d'interactions (oligosaccharides externes) toutes les glucosamines sont N-sulfatées, et que deux des acides uroniques sont de type iduronate-2-O-sulfaté. Le domaine interne de la molécule contient de nombreuses glucosamines N-acétylées et des acides glucuroniques.



La structure que nous avons proposée (a) sert de modèle pour l'obtention d'un "néoglycoconjugé" (b), constitué d'un bras espaceur, de longueur variable, lié à deux hexa ou octasaccharides (c). D'après Lubineau *et al.* 1997.



\* *L'interaction IFN $\gamma$ /héparane sulfate, vue par l'IFN $\gamma$*

L'utilisation des méthodes d'analyses chimiques ou enzymatiques a permis de proposer un modèle pour la structure oligosaccharidique que reconnaît l'IFN $\gamma$  sur une molécule d'héparane sulfate. Ce site d'interaction est complexe, et recouvre différents domaines structuraux de la molécule d'héparane sulfate tels que nous les avons définis ci-dessus. Il est composé de deux régions de 3 ou 4 disaccharides (dont les glucosamines sont toutes N-sulfatées, et deux des acides uroniques sont de type acide iduronique 2-O-sulfaté), reliées entre elles par un long domaine (16 disaccharides) riche en glucosamines N-acétylées. Les deux hexa/octa-saccharides externes interagissent avec les deux extrémités C-terminales de la forme dimérique de l'IFN $\gamma$ , le domaine acétylé central formant un pont moléculaire entre les deux monomères de la cytokine (voir article 14).

Certaines questions restent encore posées, notamment le rôle et la taille minimum du domaine interne, ou l'importance particulière des différents groupes sulfates situés dans les régions externes de la molécules. Pour tenter de répondre à ces questions, en collaboration avec le Pr. Lubineau de l'université d'Orsay, nous avons entrepris une démarche chimique qui consiste à greffer différents oligosaccharides (GlcNS6S-IdoA2S)<sub>n</sub>, (n = 3 ou 4) à un bras espaceur dérivé du polyéthylène glycol, dont on peut faire varier la taille. Ces différentes préparations pourront être testées pour leur capacité à lier l'IFN $\gamma$ , et à moduler son activité biologique (voir chapitre III). En collaboration avec le Dr. Imberty (université de Grenoble), nous essayons également de modéliser un complexe héparane sulfate/IFN $\gamma$ .

La structure, reconnue par l'IFN $\gamma$  dans une molécule d'héparane sulfate est très différente des autres séquences déjà identifiées comme celles que reconnaissent, par exemple, le facteur de croissance des fibroblastes ou de l'antithrombine III. Plus récemment, en utilisant la même stratégie que celle développée pour l'IFN $\gamma$ , la structure des héparanes sulfates se liant au facteur plaquettaire 4 (Stringer *et al.* 1997) et à l'interleukine-8 (Spillmann *et al.* 1998) a été déterminée. Leur organisation générale est semblable à celle liant l'IFN $\gamma$ : deux courtes séquences de type héparine, reliées entre elle par un domaine dont les glucosamines sont principalement N-acétylées, fixant la forme dimérique (IL-8) ou tétramérique (PF-4) de leur ligand.

## PLANCHE VI

Elimination plasmatique de  $^{125}\text{I}$ -IFN $\gamma$  humain, injecté chez le rat, seul ou associé à de l'héparine.

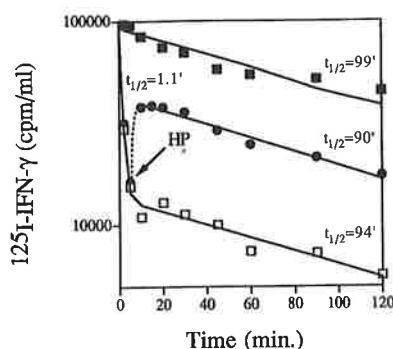


FIG. 1. Blood clearance of IFN- $\gamma$  after a bolus intravenous injection of IFN- $\gamma$  alone or in combination with heparin. Blood samples were collected at the indicated times following  $^{125}\text{I}$ -IFN- $\gamma$  injection, and the plasma trichloroacetic acid-precipitable radioactivity was determined. The fitted pharmacokinetic equations (solid lines) have been superimposed on the experimental data:  $\square$ , IFN- $\gamma$  alone;  $\blacksquare$ , IFN- $\gamma$  in combination with heparin;  $\bullet$ , IFN- $\gamma$  followed 8 min later by heparin injection, as indicated by the arrow. Injected alone, IFN- $\gamma$  was cleared from the bloodstream in a biexponential manner, with an early phase half-life of 1.1 min and a second phase half-life of 94 min. In contrast, bound to heparin (either injected with heparin or released into the bloodstream by the heparin injection; dashed line), the cytokine was eliminated in a monoexponential manner with a  $t_{1/2}$  of 99 and 90 min, respectively.

Paramètres pharmacocinétiques de l'IFN $\gamma$  humain, injecté chez le rat, seul ou associé à de l'héparine.

TABLE I  
Time profiles of plasma disappearance of IFN- $\gamma$  injected alone (IFN- $\gamma$ ) or bound to heparin (IFN- $\gamma$ /heparin) fitted to exponential equations as described in Fig. 1

Coefficients and exponents of these equations were used to determine the blood volume ( $V_b$ ), the volume of distribution at steady state ( $Vd_{ss}$ ), the plasma clearance rate ( $Cl_p$ ), the area under curve ( $AUC_{0-\infty}$ ), and the elimination half-life ( $t_{1/2}$ ).

	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ /heparin
$V_b$ (ml)	40	43
$Vd_{ss}$ (ml)	262	43.5
$Cl_p$ (ml.min $^{-1}$ )	2.1	0.32
$AUC_{0-\infty}$ (cpm.min.ml $^{-1}$ )	$1.93 \times 10^6$	$1.25 \times 10^7$
$t_{1/2}$		
$\lambda_1$ (min)	1.1	99
$\lambda_2$ (min)	94	NA <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Not available when data are described by a monoexponential equation.

### III. ROLE FONCTIONNEL DE L'INTERACTION IFN $\gamma$ /HS

\* *Les héparanes sulfates participent à l'élimination plasmatique et au ciblage tissulaire de l'IFN $\gamma$ .*

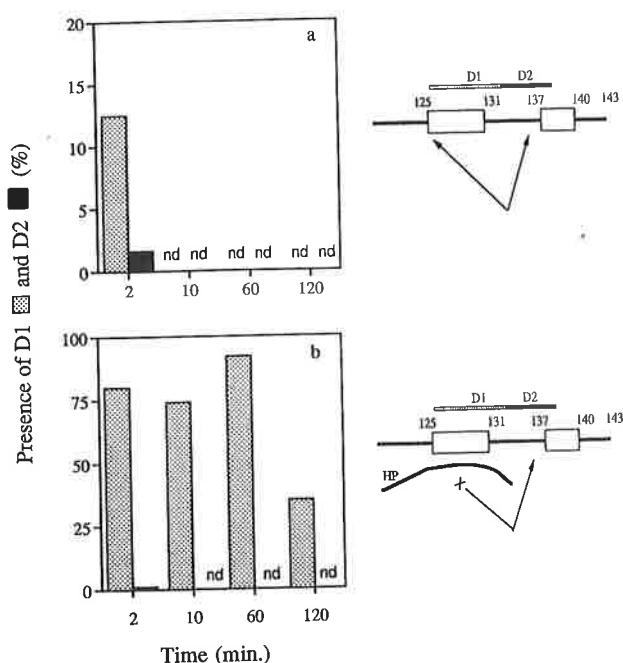
*In vivo*, le récepteur de l'IFN $\gamma$  et les molécules d'héparanes sulfates représentent deux sites de fixation connus pour l'IFN $\gamma$ . L'IFN $\gamma$  humain (qui ne reconnaît pas le récepteur murins) peut être utilisé chez l'animal, afin d'étudier le rôle des héparanes sulfate tout en s'affranchissant des interactions dues au récepteur. En utilisant un tel système hétérologue (IFN $\gamma$  humain injecté chez le rat), nous avons pu démontrer que l'héparane sulfate était responsable de l'élimination plasmatique et du ciblage tissulaire de l'IFN $\gamma$ .

Après une injection intraveineuse, l'IFN $\gamma$  est éliminé par un processus biexponentiel, au cours duquel 90% de la cytokine disparaît de la circulation sanguine pendant les 5 à 10 premières minutes, avec un temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 1,1 minutes. Les 10% restants sont éliminés du flux sanguin beaucoup plus lentement, avec un  $t_{1/2}$  de 94 minutes. Nous avons pu montrer que cette fraction circulante correspondait à des molécules d'IFN $\gamma$  dont l'extrémité C-terminale (où sont situés les sites d'interaction avec les héparanes sulfates) avait été coupée par protéolyse. Ainsi, cette fraction dépourvue d'extrémité C-terminale ne fixe plus les héparanes sulfates, et reste dans le flux sanguin. De façon à masquer les sites de fixation à l'héparane sulfate nous avons également injecté la cytokine complexée à de l'héparine. Dans ce cas, l'IFN $\gamma$  est éliminé de façon monoexponentielle, avec un  $t_{1/2}$  de 99 minutes. Enfin, l'injection d'héparine quelques minutes après l'administration d'IFN $\gamma$  remet dans la circulation la cytokine qui avait été préalablement éliminée. L'ensemble de ces résultats démontre qu'une large proportion (# 90%) de l'IFN $\gamma$  injecté est rapidement fixé par des molécules de type héparine/héparane sulfate, vraisemblablement à la surface de l'endothélium vasculaire, puis pénètre dans les tissus. En revanche, lorsque l'interaction IFN $\gamma$ /héparane sulfate est bloquée, la cytokine reste dans le flux sanguin (taux d'élimination plasmatique fortement diminué, volume de distribution à l'équilibre égale au volume sanguin). *In vivo*, il existe donc une compétition entre la protéolyse des domaines C-terminaux de l'IFN $\gamma$  et l'interaction avec les héparanes sulfates.

Enfin l'observation autoradiographique des coupes tissulaires montre que l'IFN $\gamma$ , marqué à l'iode 125, n'a pas accès de manière identique à tous les tissus. Il s'accumule, par exemple, dans le foie, le rein et la rate, mais pas dans le muscle. De plus, au sein d'un même tissu, il n'est pas réparti de façon homogène et se trouve concentré de façon extrêmement localisé. De telles concentrations locales sont détectées par exemple dans les sinusoides hépatiques (à la surface des hépatocytes et des

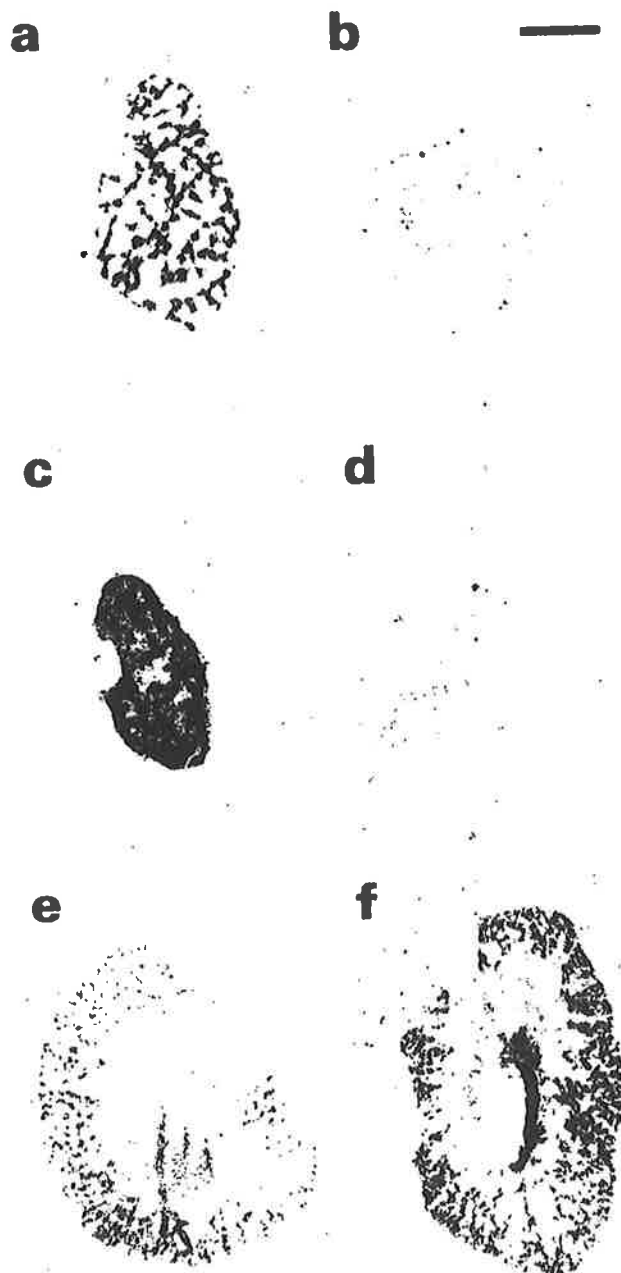
## PLANCHE VII

### Mécanisme d'augmentation de l'activité antivirale de l'IFN $\gamma$ .



**FIG. 4. Processing of the carboxyl-terminal domain of IFN- $\gamma$  injected alone or in combination with heparin.** Injected alone (panel a), IFN- $\gamma$  was processed rapidly and lost the D1 (dotted bar) and D2 (closed bar) carboxyl-terminal domains, indicating that it was shortened by cleavages upstream of the heparin binding site. In contrast, coinjected with heparin (panel b), the D1 domain was preserved although the D2 domain was removed within a few min. *nd*, not detected. The model depicts the structure of the IFN- $\gamma$  carboxyl terminus. The two boxes represent the two clusters of basic amino acids, which are highly susceptible to proteolytic cleavages (14), the first one (125–131) being the heparin/heparan sulfate binding domain (16). The arrows indicate some of the possible enzymatic cleavage sites (14). The D1 and D2 domains defined by the two monoclonal antibodies that we used are also indicated. In the absence of heparin, the IFN- $\gamma$  carboxyl-terminal part is cleaved readily (loss of D1 and D2); however, bound to heparin (HP), D1 is protected, and the cytokine is only shortened downstream of the heparin binding site (loss of D2 only).

*In vivo*, l'IFN $\gamma$  libre est coupé de telle sorte qu'il perd les domaines C1 et C2, et est ainsi inactivé (voir aussi planche III, page 14). Ces coupures interviennent quelques minutes après l'injection (a). Néanmoins, la majorité de l'IFN $\gamma$  injecté s'associe aux molécules d'héparanes sulfates (planche IV, page 16). Les molécules d'héparine ou d'héparane sulfate, associés à l'IFN $\gamma$  limitent l'étendue des coupures de la molécules au domaine C2 (b), ce qui augmente son activité spécifique. Ainsi, l'interaction IFN $\gamma$ /héparane sulfate concentre localement la cytokine dans les tissus (partie droite de la planche, a-f) et régule son activité spécifique.



**Figure 3. Tissue distribution of [ $^{125}$ I]-IFN- $\gamma$ .**

Ten min after an i.v. administration of [ $^{125}$ I]-IFN- $\gamma$  either alone (a, c, e) or bound to heparin (b, d, f), the liver (a, b), spleen (c, d) and kidney (e, f) were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen. Cryostat sections (10  $\mu$ m) were applied to slides and exposed under autoradiographic films. Darkened areas correspond to positive signals, and are distributed in restricted areas in the liver, more homogeneously in the spleen, and in the cortical area of the kidney. Heparin strongly reduced the signal in the liver and spleen, but not in the kidney. Scale bar = 0.25 cm.

cellules endothéliales), dans les glomérules reinaux ou dans la pulpe rouge de la rate. Lorsque l'interaction IFN $\gamma$ /héparane sulfate est rendue impossible l'accumulation tissulaire de l'IFN $\gamma$  est complètement inhibée dans le foie et dans la rate, alors que dans le rein on retrouve de fortes concentrations de cytokine dans les tubes proximaux (articles 18 et 19).

*\* Les héparanes sulfates régulent l'activité antivirale de l'IFN $\gamma$ .*

L'activité biologique de l'IFN $\gamma$  a été mesurée, en fonction du temps, dans le flux sanguin de rats, qui avaient subi une injection d'IFN $\gamma$  humain, couplé ou non à de l'héparine. Nous avons observé une diminution rapide de l'activité de l'IFN $\gamma$  injecté seul, indiquant une dégradation de la cytokine. En revanche, injecté en présence d'héparine, une augmentation de 600 % de l'activité spécifique de la molécule a été mesurée. L'utilisation de deux anticorps monoclonaux reconnaissant deux épitopes contigus localisés dans l'extrémité C-terminale de l'IFN- $\gamma$  (région 125-134 qui contient donc le domaine d'interaction avec l'héparane sulfate, et région 131-137, en aval du domaine d'interaction avec l'héparane sulfate) a permis de montrer par une analyse radioimmunologique qu' *in vivo* l'interaction IFN $\gamma$ /héparine limitait l'étendue de coupures protéolytiques de l'extrémité C-terminale, alors que non complexé à l'héparine, l'IFN $\gamma$  subissait des coupures plus importantes de cette extrémité. Ce processus de protéolyse limité au domaine C-terminal de l'IFN $\gamma$  est rapide, et intervient dans les premières minutes après l'injection. Par ailleurs, *in vitro* nous avons pu vérifier qu'un IFN $\gamma$  tronqué en aval du site d'interaction avec l'héparane sulfate avait une activité augmentée, alors que les coupures dans, ou en amont, de ce site inactivaient la cytokine. L'héparine module donc l'activité biologique de l'IFN $\gamma$  (activité anti virale) en modulant l'étendue de coupures protéolytiques dans son extrémité C-terminale. Ce phénomène représente un nouveau mécanisme de régulation de l'activité d'une cytokine (article 19).

*\* In vivo, l'activité de l'IFN $\gamma$  se surperpose à la distribution tissulaire des héparanes sulfates.*

L'importance des interactions IFN $\gamma$ /héparane sulfate pour une autre activité de la cytokine (diminution de la synthèse de collagène) a été également vérifiée dans un modèle de fibrose hépatique.

La fibrose, qui se caractérise par une accumulation des composés de la matrice extracellulaire, est la conséquence d'une balance inappropriée entre synthèse et dégradation des molécules de la matrice. La bilharziose murine, un des modèles de référence en matière de fibrose hépatique a été utilisée pour cette étude. Dans la bilharziose à *Schistosoma mansoni*, l'agent pathogène (le ver) libère des

oeufs dans les veines mésentériques. Ceux-ci sont véhiculés par le sang portal jusqu'au foie, où ils se trouvent enclavés dans les veinules portes. Une fibrose se développe alors, autour de l'oeuf (fibrose périovulaire), et entre les travées hépatocytaires (fibrose périsinusoïdale). Différents travaux antérieurs avaient montré que la fibrose périovulaire était caractérisée par un enrichissement en dermatane sulfate et une absence d'héparane sulfate. Cette répartition différentielle des héparanes sulfates dans le foie nous a donc permis d'étudier leur rôle vis-à-vis de l'activité biologique de l'IFN $\gamma$ .

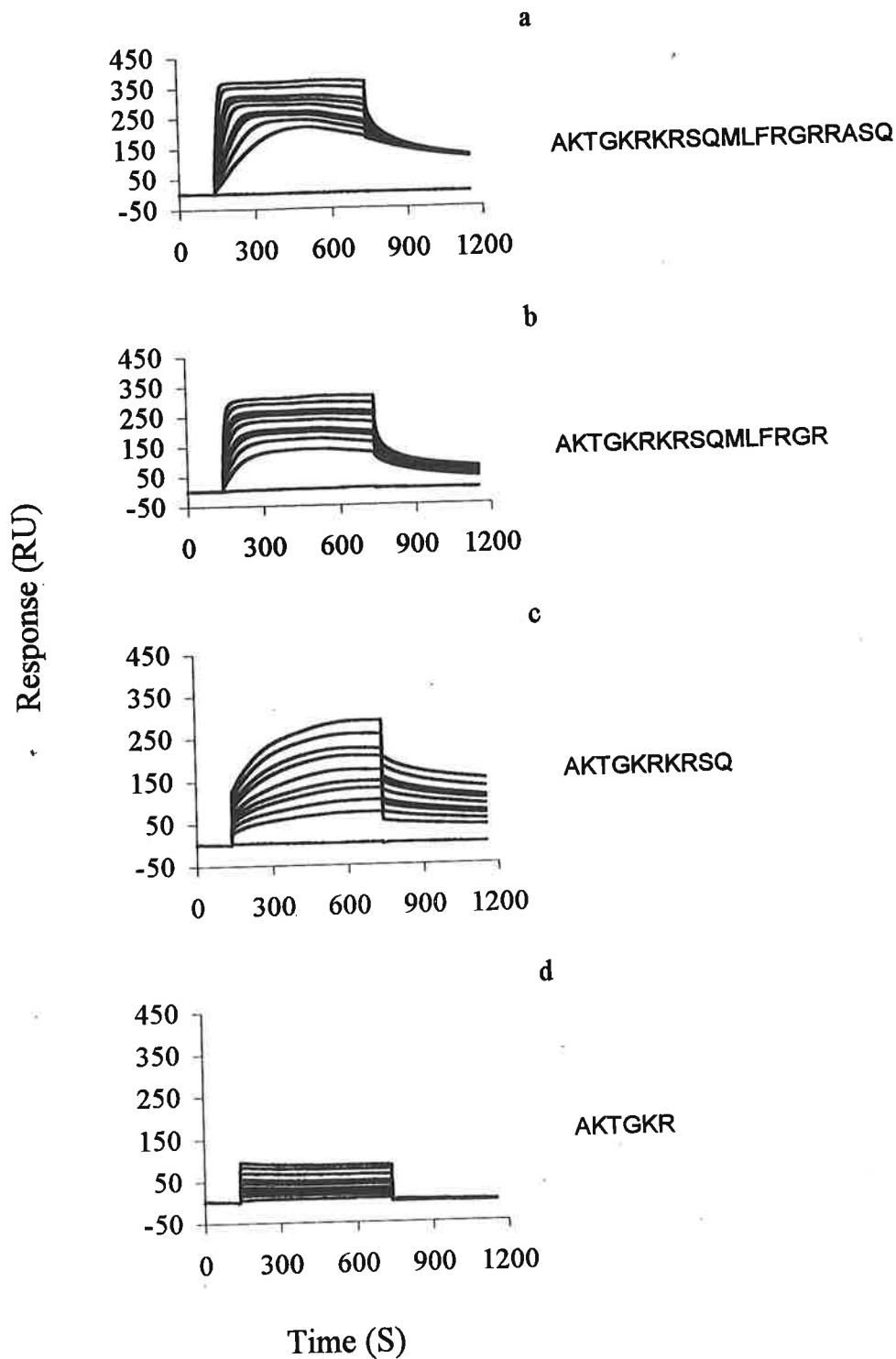
Le traitement de souris infestées depuis quatre semaines par *S. mansoni* a consisté en 20 injections intramusculaires d'IFN $\gamma$ , à raison de 3 injections par semaine, et l'effet de l'IFN $\gamma$  sur les dépôts de collagène a été analysé, en distinguant la fibrose périovulaire de la fibrose périsinusoïdale. L'IFN $\gamma$  induit une baisse significative (30 %) du collagène dans le foie total des souris infestées. Cependant les analyses histologiques ont montré que la baisse de synthèse du collagène ne se produit pas de façon homogène dans le foie: le dépôt collagénique périsinusoïdal a diminué sous l'effet de l'IFN $\gamma$ , alors que le dépôt collagénique périovulaire (granulome bilharzien) ne semble pas affecté par ce traitement. De fait, le dosage biochimique du collagène réalisé sur les granulomes isolés, et sur le reste du foie a montré que l'IFN $\gamma$  n'avait pas eu d'action dans les granulomes alors qu'il avait diminué de 75 % la quantité de collagène accumulé dans le parenchyme. Dans le foie, l'effet de l'IFN $\gamma$  est donc ciblé, et se superpose à la présence des héparanes sulfates. *In vivo*, une interaction entre IFN $\gamma$  et héparane sulfate pourrait rendre compte de l'effet localisé de la cytokine (voir article 22).

#### IV. ASPECT DYNAMIQUE DES INTERACTIONS IFN $\gamma$ /HEPARANE SULFATE

Outre la caractérisation biochimique des interactions IFN $\gamma$ /IFN $\gamma$ R et IFN $\gamma$ /héparane sulfate, les données accumulées jusqu'à présent indique que, *in vivo*, l'IFN $\gamma$  libre subit une protéolyse complète de son extrémité C-terminale, dont les conséquences sont une perte de son activité antivirale. En revanche, lié aux héparanes sulfates, les coupures que subit l'IFN $\gamma$  sont limités aux derniers 10 acides aminés, un processus qui augmentent l'activité biologique de la cytokine. Au vue de ces résultats, nous avons fait l'hypothèse que l'IFN $\gamma$  doit posséder une caractéristique structurale lui permettant d'interagir avec les héparanes sulfates, suffisamment rapidement pour échapper à une dégradation extensive de son domaine C-terminal.

## PLANCHE VIII

Analyse cinétique de l'interaction IFN $\gamma$ /héparine.



L'IFN $\gamma_{143}$  (a), l'IFN $\gamma_{137}$  (b), l'IFN $\gamma_{133}$  (c), ou l'IFN $\gamma_{129}$  (d) ont été injectés à la surface d'un biocapteur (Biacore) sur lequel nous avons immobilisé un fragment d'héparine de 9 kDa. La phase d'association est extrêmement rapide pour l'IFN $\gamma_{143}$  et l'IFN $\gamma_{137}$ , et l'équilibre est atteint en quelques secondes. L'IFN $\gamma_{133}$  est caractérisé par une constante d'association réduite de 200 fois par rapport à l'IFN $\gamma_{143}$ . L'IFN $\gamma_{129}$  a perdu la capacité de s'associer à l'héparine.

*\*Analyses cinétiques de l'interaction IFN $\gamma$ /héparine*

Pour mettre en évidence l'existence éventuelle d'une telle structure, nous avons entrepris une analyse cinétique de l'interaction IFN $\gamma$  avec un fragment d'héparine de 9 kDa immobilisé par son extrémité réductrice à la surface d'une sensorchip Biacore. La constante d'association de l'IFN $\gamma$  vis-à-vis de cette molécule est extrêmement élevée ( $k_{on} \# 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ ), et indique qu'effectivement l'IFN $\gamma$  a la capacité de s'associer à l'héparine de façon quasi immédiate. De façon surprenante, l'interaction l'IFN $\gamma_{133}$ /héparine est caractérisée par une constante d'association beaucoup plus faible ( $k_{on} \# 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ ). Ce résultat est en apparente contradiction avec les données obtenues à l'équilibre, qui indiquaient que seule la région 125-131 (région qui est présente dans l'IFN $\gamma_{133}$ ) était impliquée dans le complexe IFN $\gamma$ /héparine. Enfin, l'IFN $\gamma_{129}$ , a complètement perdu la capacité de s'associer à l'héparine, démontrant l'importance du couple Lys-Arg (position 130-131) pour l'interaction.

*\*Mécanisme de l'interaction*

De façon générale, le taux d'association entre deux molécules complémentaires est déterminé par le temps nécessaire aux deux molécules pour se rencontrer, et par la probabilité que cette collision conduise à la formation d'un complexe. Pour deux molécules sphériques, uniformément réactives, de la taille d'une protéine, l'équation de Smoluchowski donne une constante d'association de l'ordre de  $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$  (Berg *et al.* 1981), ce qui est bien supérieur aux constantes d'associations observées expérimentalement. Ceci tient au fait que pour deux protéines données, la totalité de leur surface n'est pas entièrement réactive l'une vis-à-vis de l'autre. Un grand nombre de collisions peut donc être nécessaire avant que les deux molécules ne se présentent dans une orientation favorable à la formation d'un complexe stable. Par exemple, les constantes d'associations observées pour une réaction antigène-anticorps typique sont de l'ordre de  $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ . C'est aussi l'ordre de grandeur observé pour l'interaction IFN $\gamma_{133}$ /héparine. L'analyse cinétique, décrite ci-dessus, montre que la présence du domaine 134-143 augmente très considérablement la constante d'association de l'IFN $\gamma$  pour l'héparine (de  $5 \times 10^4$  à  $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ ), mais qu'en revanche ce domaine n'est pas nécessaire à la stabilité du complexe. Cette région de la protéine, qui contient trois résidus arginines (...RGRR...), est caractérisé par une charge positive. Il est possible que cette charge oriente la molécule d'IFN $\gamma$  vis-à-vis de l'héparine, de telle sorte que le nombre de collisions productives soit augmenté. Un tel mécanisme avait été proposé, d'un point de vue théorique, par Berg et von Hippel, pour expliquer les phénomènes de translocation de protéines sur des acides nucléiques (Berg *et al.* 1981; Berg and



## PLANCHE IX

$\text{IFN}\gamma_{143}$  ( $k_a = 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )

**C1**

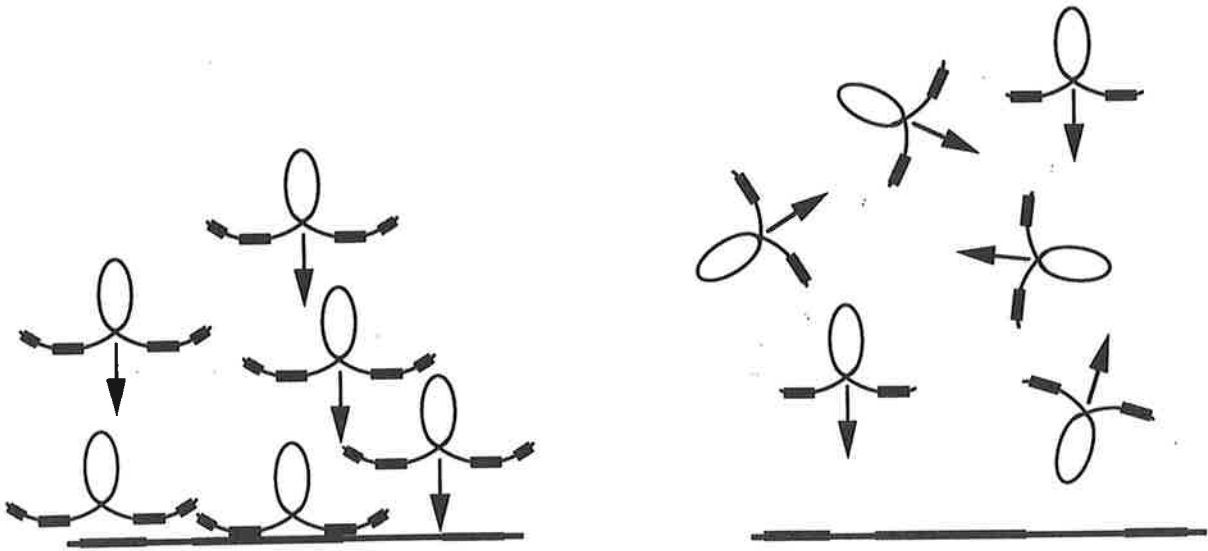
**AKTGKRKRSQMLFRGRRASQ**

**C2**

$\text{IFN}\gamma_{133}$  ( $k_a = 5 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )

**C1**

**AKTGKRKRSQ**



**Héparane sulfate**

A l'équilibre, seule la séquence 125-131 (C1) du domaine carboxy terminal de l'IFN $\gamma$  est impliquée dans l'interaction IFN $\gamma$ /héparane sulfate. Ainsi, l'IFN $\gamma_{143}$  et l'IFN $\gamma_{133}$  peuvent former un complexe stable avec l'héparane sulfate. La séquence 137-140 (C2) augmente le nombre de collisions productives entre IFN $\gamma$  et héparane sulfate, car les molécules se présentent l'une à l'autre par leur domaine d'interaction, et non de façon aléatoire. Ce modèle, spéculatif, rend compte des différences de constantes d'association des IFN $\gamma_{143}$  et IFN $\gamma_{133}$  pour l'héparine (planche VIII). Il rend également compte de la protéolyse possible du domaine C2 - mais pas du domaine C1 - observée lorsque l'IFN $\gamma$  est associé à une molécule d'héparine (planche VII).

von Hippel 1985; von Hippel and Berg 1989). Ainsi la région 134-143, qui n'interagit pas de façon spécifique avec l'héparine permettrait, par un effet d'orientation, l'augmentation de la constante d'association que caractérise la formation du complexe IFN $\gamma$ /héparine. Le mécanisme proposé ici est compatible avec les données obtenues à l'équilibre qui indiquaient la seule participation de la séquence 125-131 dans le complexe IFN $\gamma$ /héparine.

*\*Un modèle pour la communication cellulaire dont l'IFN $\gamma$  est le médiateur*

L'ensemble de ces données permet de proposer un modèle, spéculatif, de communication entre cellules, qui rend compte des différentes interactions que l'IFN $\gamma$  contracte dans l'espace extracellulaire.

Après avoir été sécrété, l'IFN $\gamma$  s'associe de façon rapide avec les molécules d'héparanes sulfates. Cette première interaction est nécessaire, car elle protège le domaine C-terminal de la cytokine d'une dégradation complète dont la conséquence serait une perte d'activité. Le caractère immédiat de cette interaction est rendu possible par la présence de la séquence 134-143 qui augmente très fortement la constante d'association IFN $\gamma$ /héparine. Rappelons ici, que lié à l'héparine, l'IFN $\gamma$  ne peut pas s'associer à son récepteur, et se trouve donc sous une forme immobilisée et non active. Néanmoins, sous cette forme, il peut subir une ou des coupures en aval de l'acide aminé 133. Cette protéolyse limitée a trois effets principaux: elle diminue considérablement l'affinité de la cytokine pour l'héparine, elle augmente l'affinité pour le récepteur (ce qui permettrait un transfert de l'IFN $\gamma$  de l'héparane sulfate vers son récepteur), enfin, elle augmente l'activité spécifique de la protéine.

Les mécanismes décrits ci-dessus permettent donc d'immobiliser l'IFN $\gamma$  dans un environnement particulier, puis de le libérer sous une forme activée pour interagir avec une cellule cible.

## V. BIBLIOGRAPHIE

Aguet M., Dembic Z., and Merlin Gilles. 1988. Molecular cloning and expression of the human interferon- $\gamma$  receptor. *Cell*, 55, 273-280.

Bader T., and Wietzerbin J. 1994. Nuclear accumulation of interferon- $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 11831-11835.

Berg O.G., Winter R.B., and von Hippel P. 1981 Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. Models and theory. *Biochemistry*. 20, 6929-6948.

- Berg O.G., and von Hippel P. 1985. Diffusion-controlled macromolecular interactions. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 14, 131-160.
- Billiau A. 1996. Interferon- $\gamma$ : Biology and role in pathogenesis. *Adv. Immunol.* 62, 61-130.
- Boehm U., Klamp T., Groot M., and Howard J.C. 1997. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Ann. Rev. Immunol.* 15, 749-795.
- Casu B., Petitou M., Provasoli M., and Sinaÿ P. 1988. Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. *Trends Biochem. Sci.* 13, 221-225.
- Choay J., Lormeau J.-C., Petitou M., Sinaÿ P., and Fareed J. 1981. *N. Y. Acad. Sci.* 370, 644-649.
- Cifonelli J.A. 1968. Reaction of heparitin sulfate with nitrous acid. *Carbohyd Res.* 8,233-242.
- Conrad H.E. 1997. Heparin-binding protein. *Conrad H.E. Ed. Academic press* 1-527.
- David G. 1993. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J.* 7, 1023-1030.
- DiGabriele A.D., Lax I., Chen D.I., Svahn C.M., Jaye M., Schlessinger J., and Hendrickson W.A. 1998. Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor. *Nature.* 393, 812-817.
- Ernst S., Langer R., Cooney C.L., and Sasisekharan R. 1995. Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 387-444.
- Esko J.D. 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 805-816.
- Gallagher J.T. 1989. The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 1201-1218.
- Greenlund A.C., Schreiber R.D., Goeddel D.V., and Pennica D. 1993. Interferon- $\gamma$  induces receptor dimerization in solution and on cells. *J. Biol. Chem.* 268, 18103-18110.
- Guimond S., Maccarana M., Olwin B.B., Lindahl U., and Rapraeger A.C. 1993. Activating and inhibitory sequences for FGF-2 (basic FGF). *J. Biol. Chem.* 268, 23906-23914.
- Hardingham T.E., and Fosang A.J. 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6, 861-870.
- Hemmi S., Böhni R., Stark G., Di Marco F., and Aguet M. 1994. A novel member of the interferon receptor family complements functionality of the murine interferon- $\gamma$  receptor in human cells. *Cell.* 76, 803-810.
- Hilemman R.E., Fromm J.R., Weiler J.M., and Linhardt R.J. 1998. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of a consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *BioEssays*, 20, 156-167.

- Iozzo R.V. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 609-652.
- Iozzo R.V., and Murdoch A.D. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 10, 598-614.
- Johnson H.M., Torres B.A., Gree M.M., Szente B.E., Siler K.I., Larkin K., and Subramaniam P.S. 1998. Cytokine-receptor complexes as chaperones for nuclear translocation of signal transducers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 244, 607-614.
- Lubineau A., Escher S., and Bonnaffé D. 1997. Stereoselectivity control in anomeric O-alkylation. Application to the synthesis of C<sub>2</sub> symmetric glycoconjugates. *Tetr. lett.* 38,4087-4090.
- Lundell D.J., and Narula S.K. 1994. Structural elements required for receptor recognition of human interferon-gamma. *Pharmac. Ther.* 64, 1-21.
- Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., and Choay J. 1988. Binding of heparin to antithrombin III: a chemical proof of the critical role played by a 3-sulfated 2-amino-2-deoxy-D-glucose residue. *Carbohydr. Res.* 179, 163-172.
- Rinderknecht E., O'Connor B.H., and Rodriguez H. 1984. Natural human interferon-g. Complete amino acid sequence and sites of glycosylation. *J. Biol. Chem.* 259, 6790-6797.
- Sakatsume M., Igarashi K.I., Winestock K.D., Garotta G., Lerner A.C., and Finbloom D.S. 1995. The Jak kinase differentially associate with the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of the interferon- $\gamma$  receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors. *J. Biol. Chem.* 270, 17528-17534.
- Salmivirta M., Lidholt K., and Lindahl U. 1996. Heparan sulfate: a piece of information. *FASEB J.* 10, 1270-1279.
- Serini G., Bochaton-Piallat M.L., Ropraz P., Geinoz A., Borsi L., Zardi L., and Gabbiani G. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- $\beta$ 1. *J. Cell. Biol.* 142, 873-881.
- Spillmann D., and Lindahl U. 1994. Glycosaminoglycan-protein interactions: a question of specificity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 677-682.
- Spillmann D., Witt D., and Lindahl U. 1998. Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *J. Bio. Chem.* 273, 15487-15493.
- Stringer S.E., and Gallagher J.T. 1997. Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 272, 20508-20514.
- Todd P.A. and Goa K.L. 1992. Interferon-gamma. A review of its pharmacology and therapeutic potential in chronic granulomatous disease. *Drugs.* 43, 111-122.

- Turnbull J.E., Fernig D.G., Ke Y., Wilkinson M.C., and Gallagher J.T. 1992. Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 267, 10337-10341.
- Valente G., Ozmen L., Novelli F., Geuna M., Palestro G., Forni G., Garotta G. 1993. Distribution of interferon- $\gamma$  receptor in human tissues. *Eur. J. Immunol.* 22, 2403-2412.
- Van Loon A.P.G.M., Ozmen L., Fountoulakis M., Kania M., Haiker M., and Garotta G. 1991. High-affinity receptor for interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), a ubiquitous protein occurring in different molecular forms on human cells. *J. Leukoc. Biol.* 49, 462-476.
- Venkataraman G., Sasisekharan V., Cooney C.L., Langer R., and Sasisekharan R. 1994. A stereochemical approach to pyranose ring flexibility: its implications for the conformation of dermatan sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 6171-6175.
- Von Hippel P., and Berg O.G. 1989. Facilitated target location in biological systems. *J. Biol. Chem.* 264, 675-678.
- Walter M.R., Windsor W.T., Nagabhushan T.L., Lundell D.J., Lunn C.A., Zauodny P.J., and Narula S.K. 1995. Crystal structure of a complex between interferon- $\gamma$  and its soluble high affinity receptor. *Nature* 376, 230-235.
- Yanagishita M. and Hascall V.C. 1992. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 267, 9451-9454.

---

## VIII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

### Les héparanes sulfates, une "plaque tournante"?

Les héparanes sulfates, associés de façon covalente à une protéine pour former les protéoglycanes, sont des composants ubiquitaires des matrices extracellulaires, (Gallagher 1989. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 1201-1218; Iozzo 1998. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 609-652). Ils sont également exprimés en quantité importante à la surface des cellules (David 1993. *FASEB J.* 7, 1023-1030). Cette double localisation les positionnent de façon stratégique pour réguler les interactions de la cellule avec son environnement. De fait, de nombreuses protéines, très diverses, interagissent avec les protéoglycanes, comme des enzymes, des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines, des molécules de la matrice extracellulaire, des protéines virales, des récepteurs transmembranaires, des sélectines, et bien d'autres encore (Conrad 1997. *Conrad H.E. Ed. Academic press* 1-527). La grande plasticité structurale de ces molécules, et leur grande diversité permettent sans doute d'associer une certaine spécificité des interactions avec une très large capacité interactive.

Les travaux que nous avons conduits jusqu'à présent, ainsi que d'autres études récentes menées sur les glycosaminoglycanes convergent vers l'idée que ces molécules participent à la constitution d'une spécificité tissulaire des réactions, notamment celles médiées par les cytokines ou les facteurs de croissances, dont ils changent les équilibres de diffusion et la réactivité. Ainsi, les héparanes sulfates qui peuvent inhiber, activer, localiser, stocker ou présenter des effecteurs moléculaires, représentent à l'interface cellules-cellules une "plaque tournante" dans les phénomènes de communications cellulaires.

Les glycosaminoglycanes sont, de fait, impliqués dans la régulation de nombreux aspects dynamiques du comportement cellulaire, et participent de façon active à différents phénomènes physiologiques ou pathologiques. L'étude des glycosaminoglycanes intéresse notamment, de façon directe, différents aspects de la virologie.

## PLANCHE X

### Interaction Virus/glycosaminoglycanes.

Virus	Type	Gag	Réfs
Herpes Simplex virus-1	$\alpha, \beta, \gamma$ , herpes virus	HS	1
Herpes Simplex virus-2		"	2
Herpes Simplex virus-7		"	3
Cytomégalovirus		"	4
Pseudorabies virus		"	5
Varicella zoste virus		"	6
Foot-and-Mouth Disease virus	Picornavirus	HS	7
Vaccinia virus	Poxvirus	HS	8
Cowpox virus		"	
Rabbitpox virus		"	
Shope fibroma virus		"	
Myxoma virus		"	
Dengue virus	Flavivirus	HS	9
HIV	Lentivirus	HS	10
Tat gp120-gp41		"	11,12
Sindbis virus	Alphavirus	HS	13
Adeno-associated virus	parvovirus	HS	14

HS: héparane sulfate

1. Feyzi E. *et al.* 1997. *J. Biol. Chem.* 272, 24850-25857.
2. Wu Dum B. and Spear P.G. 1989. *J. Virol.* 63, 52-58.
3. Secchiero P. *et al.* 1997. *J. Virol.* 71, 4571-4580.
4. Boyle A.K. and Compton T. 1998. *J. Virol.* 72, 1826-1833.
5. Trybala E. *et al.* 1998. *J. Biol. Chem.* 273, 5047-5052.
6. Zhu Z. *et al.* 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 3546-3550.
7. Jackson T. *et al.* 1996. *J. Virol.* 70, 5282-5287.
8. Chung C.S. *et al.* 1998. *J. Virol.* 72, 1577-1585.
9. Chen Y. *et al.* 1997. *Nature Med.* 3, 866-871.
10. Chang H.C. *et al.* 1997. *AIDS* 11, 1421-1431.
11. Mondor I. *et al.* 1998. *J. Virol.* 72, 3623-3634.
12. Roderiguez G. *et al.* 1995. *J. Virol.* 69, 2233-2239.
13. Byrnes A.P. and Griffin D.E. 1998. *J. Virol.* 1998. 72, 7349-7356.
14. Summerford C. *et al.* 1998. *J. Virol.* 72, 1438-1445.

## Les glycosaminoglycanes, récepteurs ou co-récepteurs d' agents infectieux

On connaît aujourd'hui un nombre relativement important d'agents infectieux qui utilisent les glycosaminoglycanes pour interagir avec leurs cibles. Ainsi, certains virus (voir planche X) ont la capacité de se lier aux molécules d'héparanes sulfates exprimés à la surface des cellules. Différentes molécules de type héparine ont d'ailleurs des activités antivirales reconnues, au moins *in vitro* (par exemple Rider 1997. *Glycoconjugate J.* 14,639-642; Chen Y. *et al.* 1997. *Nature Med.* 3, 866-871). Des agents infectieux "non conventionnels" comme le prion (Caughey B. *et al.* 1994. *J. Virol.* 4, 2135-2141), mais aussi le peptide  $\beta$ -amyloïde (Watson D. *et al.* 1997. *J. Biol. Chem.* 272, 31617-31624), ou la protéine tau (Goedert M. *et al.* 1996. *Nature.* 383, 550-553), interagissent également avec les héparanes sulfates. Enfin différentes bactéries comme *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus (pyogenes et aureus)*, ainsi que certains protozoaires, *Plasmodium*, *Leishmania* ou *Trypanosome* sont connus pour se lier aux glycosaminoglycanes (pour revue voir Sawitzky D. 1996. *Med. Microbiol. Immunol.* 184,155-161). Les aspects moléculaires de l'ensemble de ces interactions n'ont été identifiés que dans quelques cas. Cependant, bien que les déterminants structuraux des interactions glycosaminoglycanes/protéines virales soient aujourd'hui peu connus, ils représentent un aspect important de la compréhension des mécanismes d'adsorption et d'internalisation des virus.

En particulier, le virus de l'hépatite C (V.H.C.) a retenu notre attention. Il n'existe pas de modèle expérimental simple d'infection par le V.H.C., et les données principales viennent de l'analyse génomique du virus. Son génome consiste en un brin ARN positif de 9500 nucléotides, codant une polyprotéine qui génère par clivages les protéines structurales et non structurales du virus. L'examen de la séquence de cette polyprotéine révèle l'existence de plusieurs motifs d'interaction possible avec les molécules d'héparines/héparanes sulfates, et nous envisageons qu'une interaction V.H.C./héparane sulfate puisse intervenir dans une des étapes conduisant à l'infection. Notons que l'infectivité du virus de la Dengue (un autre Flavivirus) dépend précisément de l'interaction d'une protéine d'enveloppe avec les héparanes sulfates des cellules cibles (Chen *et al.* 1997, *Nature Med.* 3, 866-871).

En collaboration avec le Pr. Drouet (faculté de pharmacie, Grenoble) nous testons l'hypothèse d'une importance des héparanes sulfates pour le V.H.C. dans un modèle d'infection de cellules en culture. Par ailleurs nous analyserons aussi, de façon directe, les interactions de diverses protéine virales avec les héparanes sulfates par les techniques Biacore.



## Héparane sulfate, chimiokine et co-récepteur du V.I.H.

Des molécules de la famille des chimiorécepteurs ont été identifiées comme co-facteurs de CD4 et nécessaires à l'entrée du V.I.H. dans les cellules (pour revue, Premack *et al.*, 1996. *Nature Med.*, 2, 1174-1178). Par exemple, CXCR4 est un co-récepteur du VIH dont l'utilisation par des souches virales *in vivo* est bien établie. Son expression dans les lymphocytes T et les monocytes est constitutive (Loeschter *et al.*, 1994. *J.Biol.Chem*, 269, 232-237). L'apparition de souches virales utilisant le co-récepteur CXCR4 (virus X4) est souvent citée comme un signe indicateur ou concomitant d'une évolution défavorable de l'infection. L'utilisation de ce co-récepteur est un élément important de la pathogénèse du SIDA.

L'interaction du VIH avec le co-récepteur CXCR4 peut être inhibée par son ligand naturel: la chimiokine de type CXC: SDF-1 (Oberlin *et al.*, 1996. *Nature*, 382, 833-835; Bleul *et al.*, 1996. *Nature*, 382, 829-832). Cette inhibition s'explique par deux mécanismes dynamiquement liés et dépendants de la liaison spécifique entre la chimiokine et le récepteur. Le premier est la compétition, encore mal élucidée, entre la chimiokine et le virus lui-même pour la liaison à CXCR4. Le deuxième est la résultante de la diminution de CXCR4 à la surface cellulaire par un mécanisme d'internalisation du co-récepteur par endocytose (Amara *et al.*, 1997. *J. Exp. Med.*, 186, 139-146; Signoret *et al.*, 1997. *J. Cell. Biol.*, 139, 651-664).

La structure cristallographique de SDF-1 a été résolue récemment (Dealwis *et al.*, 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6941-6946). Elle fait apparaître un site d'interaction avec les héparines/héparanes sulfates, où la majorité des acides aminés basiques de la protéine sont regroupés, de façon typique. De fait, comme nous l'avons observé récemment par analyses des interactions en temps réel (Biacore), SDF-1 se lie aux molécules d'héparines et d'héparanes sulfates, mais n'a pas d'affinité pour les autres glycosaminoglycanes. Enfin, comme en témoignent les résultats de Fernando Arenzana Institut Pasteur, Paris), avec qui nous avons engagé une collaboration, l'héparane sulfate a un effet potentialisateur important sur l'activité anti virale de SDF-1. Au vu de ces résultats, nous avons envisagé, d'une part, de rechercher l'existence de complexes naturels de protéoglycanes avec SDF-1, et d'identifier les formes physiologiques des glycosaminoglycanes qui régulent l'activité de la chimiokine, et d'autre part d'analyser les mécanismes par lesquels l'héparane sulfate potentialise l'effet inhibiteur de SDF-1 sur l'entrée du V.I.H.

---

## IX. INVITATION A DES SEMINAIRES ET A DES CONGRES

---

### I. SEMINAIRES

Dr. Juana Wietzerbin, Unité Inserm 365 "Interféron et Cytokine", Institut Curie, Paris. (Mars 1991).

Dr Geneviève Milon, Institut Pasteur, Paris (Avril 1992)

Dr Daniel Lando, Institut Scientifique Roussel, Paris (26 Juin 1992)

Dr Yves Courtois, Unité Inserm, Paris (Juillet 1992)

Dr. Thierry Vernet, Institut de Biologie Structurale, CNRS UPR 9055, Grenoble (11 décembre 1996)

Dr. François Amalric CNRS UPR 9066 Toulouse (20 décembre 1996)

Dr. Gilles Uzé, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS UMR 5535. (14 Janvier 1997)

Dr. Bernard Pau, Université de Pharmacie de Montpellier, CNRS UMR 9921 (19 février 1997)

Dr. Michel Kazatchkine, Unité Inserm 430, Paris (17 Mars 1997)

Dr. J. Turnbull, Birmingham university, Birmingham, UK (10 november 1997)

Dr. D. Fernig, Liverpool university, Liverpool, UK (11 novembre 1997)

Dr. J. Gallagher, Paterson institute, Christie hospital, Manchester, UK (12 novembre 1997)

Dr. F. Arenzana-Seisdedos, Unité d'immunologie virale, Institut Pasteur, Paris (8 juin 1998)

### II. CONGRES

**Lortat-Jacob H., Grimaud JA.** Collaborative interactions between cytokines and the extracellular matrix.

Second brazilian symposium on extracellular matrix. Campos do Jordao (Brazil), 10-13 mai 1992.

**Lortat-Jacob H., Grimaud JA.** Disponibilité locale des cytokines et rôle de la matrice conjonctive. 12<sup>ème</sup> forum de cancérologie de la société française du cancer. Paris, 12 juin 1992.

**Lortat-Jacob H., Esterre P., Grimaud JA.** Interferon-gamma, an anti-fibrogenic cytokine which binds to heparan sulfate.

Eurocellpath conference on cytokines and fibrosis. New trends in liver diseases. Lyon, 24-25 septembre 1992.

**Lortat-Jacob H., grimaud JA.** Characterization and functional roles of interferon- $\gamma$  interaction with glycosaminoglycans.

Conférences Jacques Monod. Growth factors and the extracellular matrix. Aussois, 16-20 mai 1994.

**Lortat-Jacob H.** The IFN $\gamma$ /heparan sulfate interaction: a two step process that control a multifunctional cytokine. Wenner-Gren Foundations International Symposium on Heparan Sulfate Proteoglycan. Stockholm, 22-24 avril 1999.

---

## X. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

---

### I. PUBLICATIONS

1. **Lortat-Jacob H.**, Kleinman H.K., et Grimaud J.A. Matrice conjonctive et localisation d'un signal biologique: mise en évidence d'un récepteur matriciel pour l'interféron-gamma dans les membranes basales.  
*C. R. Acad. Sci. Paris, t. 331, Série III, p. 143-147 (1990).*
2. Grimaud J.A. and **Lortat-Jacob H.** Les récepteurs matriciels aux cytokines: du concept au contrôle de la dynamique des fibrocytes tissulaires.  
*Annales de l'Institut Pasteur/Actualités. 3, 179-186, (1991).*
3. **Lortat-Jacob H.**, Kleinman H.K., and Grimaud J.A. High affinity binding of interferon-gamma to a basement membrane complex (matrigel).  
*J. Clin. Invest. 87 (3), 878-883, (1991).*
4. **Lortat-Jacob H.**, and Grimaud J.A. Interferon-gamma binds to heparan sulfate by a cluster of amino acids located on the C-terminal part of the molecule.  
*FEBS Lett. 280 (1), 152-154, (1991).*
5. **Lortat-Jacob H.**, and Grimaud J.A. IFN-gamma C-terminus function: New working hypothesis. Heparan sulfate and heparin, new targets for IFN-gamma, protect, relax the cytokine and regulate its activity.  
*Cell. Mol. Biol. 37 (3), 253-260, (1991).*
6. Emonard H., Munaut C., Melin M., **Lortat-Jacob H.**, and Grimaud J.A. Interleukin-6 does not regulate interstitial collagenase, stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases synthesis by cultured human fibroblasts.  
*Matrix 12, 471-474, (1992).*
7. **Lortat-Jacob H.**, and Grimaud J.A. Binding of interferon-gamma to heparan sulfate is restricted to the heparin-like domains and involves carboxylic -but not N-sulfated- groups.  
*Biochem. Biophys. Acta. 117 (2), 126-130, (1992).*
8. Esterre P., and **Lortat-Jacob H.** Cytokines and fibrosis: from parasitology to molecular biology (post meeting report).  
*Int. Parasitol., 434-435, (1993).*

20. **Lortat-Jacob H.** and Ricard-Blum S. Use of surface plasmon resonance (BIAcore™) for the analysis of ligand-receptor interactions.  
in *Visualization of receptors. Methods in light and electron microscopy.* Morel G. Ed. CRC press Boca Raton. 8, 161-180 (1997)
21. **Lortat-Jacob H.**, Garonne P., Banchereau J. and Grimaud J.A. Human interleukin-4 is a glycosaminoglycan-binding protein.  
*Cytokine.* 9, 101-105 (1997)
22. **Lortat-Jacob H.**, Baltzer F., Desmoulière A., Peyrol S. and Grimaud J.A. Lobular - but not periovular - inhibition of collagen deposition in the liver of *S. mansoni* infected mice using interferon- $\gamma$ .  
*J. Hepatol.* 26, 894-903 (1997)
23. Praillet C., Grimaud J.A. and **Lortat-Jacob H.** Les protéoglycanes. I: Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques ?  
*Médecine/Sciences* 4, 412-420 (1998)
24. Praillet C., **Lortat-Jacob H.** and Grimaud J.A. Les protéoglycanes. II: Rôles en pathologie.  
*Médecine/Sciences* 4, 421-428 (1998)
25. Sadir R., Forest E., and **Lortat-Jacob H.** The heparan sulfate-binding sequence of interferon- $\gamma$  increases the on rate of the interferon- $\gamma$ /interferon- $\gamma$  receptor complex formation.  
*J. Biol. Chem* 273, 10919-10925 (1998)

## II. COMMUNICATIONS

1. **Lortat-Jacob H.**, Grimaud JA. Interaction cytokines-matrice extracellulaire: un site de fixation pour l'interféron-gamma sur une membrane basale.  
4<sup>ème</sup> Journée de Recherche en Pathologie Cellulaire (GRREPAC), Paris, 13 décembre 1989.
2. **Lortat-Jacob H.**, Grimaud JA. May Extracellular matrix macromolecules have a receptor role ?  
Symposium on "Synovium-cartilage interrelationships", Bologne, 21-24 mai 1990.
3. **Lortat-Jacob H.**, Grimaud JA. Local concentrations of soluble factors in basement membranes : the case of IFN-gamma.  
Eurocellpath conference on the cellular and molecular basis of the stroma reaction to epithelial tumor. Nyon (Switzerland), 22-26 Avril 1991.
4. **Lortat-Jacob H.**, Grimaud JA. L'IFN-gamma se fixe sur l'héparane sulfate des membranes basales par son extrémité C-terminale.  
II<sup>ème</sup> colloque "Pharmacologie, médicament, thérapeutique" de la section 22 du CNRS, Poitiers, 10 juin 1991.
5. Grimaud JA., **Lortat-Jacob H.** Récepteurs matriciels aux cytokines.  
2<sup>ème</sup> journées d'actualités en physiopathologie et pharmacologie articulaires, Nancy, 19-20 Juin 1991.

6. **Grimaud JA., Lortat-Jacob H.** Matrix receptors to IFN-gamma and remodelling process of liver fibrosis.  
Cellular and molecular bases of liver cirrhosis, Rennes, 3-5 Juillet 1991.
7. **Grimaud JA., Lortat-Jacob H.** Matrix receptors to cytokine (IFN-gamma) in fibrosis.  
II<sup>nd</sup> international symposium on cutaneous development, aging and repair, Padova(Italie), 13-16 octobre 1991.
8. **Grimaud JA., Lortat-Jacob H.** Matrix receptors to cytokine (IFN-gamma) in fibrosis.  
III<sup>rd</sup> International Symposium on Schistosomiasis, Recife (Brasil), 20-25 octobre 1991.
9. **Lortat-Jacob H., Grimaud JA.** Messages from the matrix to the cell: heparan sulfate proteoglycan bind interferon-gamma and regulate its activity.  
Rencontre de la société française de tissu conjonctif. Structure et fonction des matrices extracellulaires. Lyon, 13-14 mars 1992.
10. **Grimaud JA., Lortat-Jacob H.** Matrix receptors to cytokine (IFN-gamma): a promissive concept for tissue/biomaterial research and application.  
IV<sup>th</sup> world biomaterials congress, Berlin, 24-28 Avril 1992.
11. **Lortat-Jacob H., Grimaud JA.** L'interféron-gamma: une cytokine antifibrosante qui possède un site de fixation dans la matrice extracellulaire.  
III<sup>ème</sup> colloque "thérapeutique et médicaments" de la section 22 du CNRS. Toulouse, 28-29 septembre 1992.
12. **Lortat-Jacob, Grimaud JA.** IFN-gamma is an heparan sulfate binding protein.  
Conférence Jacques Monod. Heparin binding growth factors. Aussois, 26-31 octobre 1992.
13. **Grimaud JA., Lortat-Jacob H.** Matrix receptors to cytokines in tumor stroma reaction.  
8<sup>th</sup> workshop of France-Japan co-operative cancer research program. Kanazawa, Japan, 1-2 novembre 1993.
14. **Normand C., Lortat-Jacob H., Grimaud JA.** Effet de l'interféron- $\gamma$  sur les différentes populations de protéoglycannes de fibroblastes de peau humaine.  
IV<sup>ème</sup> colloque "thérapeutique et médicaments" de la section 22 du CNRS. Strasbourg, 1-2 décembre 1993.
15. **Lortat-Jacob H., Grimaud JA.** Elucidation of the heparan sulfate binding domain for interferon- $\gamma$ .  
XIV<sup>th</sup> FECTS meeting. Lyon, 30 aout-3 septembre 1994.
16. **Lortat-Jacob H., Brisson C., Morel G., Grimaud JA.** Heparin-like molecules are involved in a mechanism which regulate the interferon- $\gamma$  activity.  
V<sup>ème</sup> colloque "thérapeutique et médicaments" de la section 22 du CNRS. Montpellier.
17. **Esterre P., Andriantsimahavandy A., Ramarcel E., Ricard-Blum S., Peyrol S., Hartmann D., Guerret S., Lortat-Jacob H., Pradinaud R., Pecarrere J.L.** The immunopathology of the cutaneous lesion in chromoblastomycosis.  
IV<sup>th</sup> congress of the european academy of dermatology and venereology. Brussels, Belgium, October 10-15 1995.
18. **Brisson C., Lambert A., Peyrol S., Lortat-Jacob H., Morel G.** Electron microscopic localization of interferon- $\gamma$  in mouse liver.  
I<sup>er</sup> congrés de la société française des microscopies. Rennes, 24-28 juin 1996.
19. **Grimaud JA., Lortat-Jacob H.** Cytoskeleton and cell-matrix interactions.  
9<sup>ème</sup> colloque international de pont- -Mousson. 23 septembre 3 octobre 1996

20. Morel G., Brisson C., Mertani H., Fernandez E., **Lortat-Jacob H.**, Lobie P.E. Nuclear localization of growth hormone (GH), its receptor (GHR), JAK and STAT proteins in tissues and CHO cells transfected with rat GHR cDNA.  
ASMBE Fall symposia, Snowbird Utah, USA. October 4-7, 1996.
21. **Lortat-Jacob H.** Analysis of the interferon- $\gamma$  binding to heparan sulfate/heparin-like molecules.  
VI<sup>th</sup> BIA symposium. Montpellier, 21-23 octobre 1996.
22. **Lortat-Jacob H.** Role of heparan sulfate/heparin-like molecules in the regulation of interferon- $\gamma$ .  
Glycobiology Gordon Conference, Ventura California, USA. February 2-7, 1997.
23. Sadir R., **Lortat-Jacob H.**, Ronsin B., Morel G. A role for caveolae in internalization of interferon- $\gamma$  ?  
2<sup>ème</sup> colloque annuel de la société française des microscopies. Nancy, 30 juin-4 juillet 1997
24. **Lortat-Jacob H.** Kinetic analysis of the interferon- $\gamma$ /heparan sulfate interaction.  
XVI<sup>th</sup> FECTS Meeting, Uppsala, Suede, 1-6 aout 1998.