

# Les protéoglycanes

## I. Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques ?

Christel Praillet  
Jean-Alexis Grimaud  
Hugues Lortat-Jacob

Les protéoglycanes sont des molécules à localisation extracellulaire, membranaire ou intracellulaire, constituées d'une protéine appelée *core protein* sur laquelle sont greffées des chaînes polysidiques dénommées glycosaminoglycanes. La diversité structurale des protéoglycanes permet la constitution de sites protéiques et/ou osidiques interagissant spécifiquement avec d'autres composants matriciels ou cellulaires, ainsi qu'avec des médiateurs solubles. Cette très grande capacité interactive permet aux protéoglycanes de participer à l'assemblage de la matrice tout en lui conférant de nombreuses propriétés rhéologiques (hydratation, résistance aux forces compressives, capacité de filtration, transparence). Les protéoglycanes règlent aussi de nombreuses activités cellulaires (prolifération, différenciation, adhérence, migration) et participent au contrôle de l'activité, de la biodisponibilité et de la stabilité de cytokines par crinopexie. Ces multiples fonctions peuvent être exploitées à des fins thérapeutiques. Ainsi, l'activité anticoagulante de l'héparine est depuis longtemps utilisée. Plus récemment, la capacité des protéoglycanes à contrôler certaines cytokines par crinopexie laisse entrevoir d'intéressantes applications (neutralisation d'effets toxiques, potentialisation d'activité) dans le traitement de différentes maladies.

### ADRESSES

J.A. Grimaud: Unité de pathologies des fibroses, Cnrs URA 1459, Institut Pasteur de Lyon, avenue Tony-Garnier, 69365 Lyon Cedex 7, France et LIP-Cnrs, Université Paris VI, Faculté de médecine Broussais-Hôtel-Dieu, 15, rue de l'École-de-Médecine, 75270 Paris Cedex 06, France. H. Lortat-Jacob: IBS-LBM, 41, avenue des Martyrs, 38027 Grenoble Cedex 01, France. C. Praillet : 14, rue Masséna, 69006 Lyon, France.

**L**a matrice extracellulaire des mammifères comprend différents types de collagène associés entre eux et interagissant avec des glycoprotéines (fibronectine, laminine...) et des protéoglycanes. En raison d'une structure très complexe et hétérogène, les protéoglycanes sont restés longtemps méconnus.

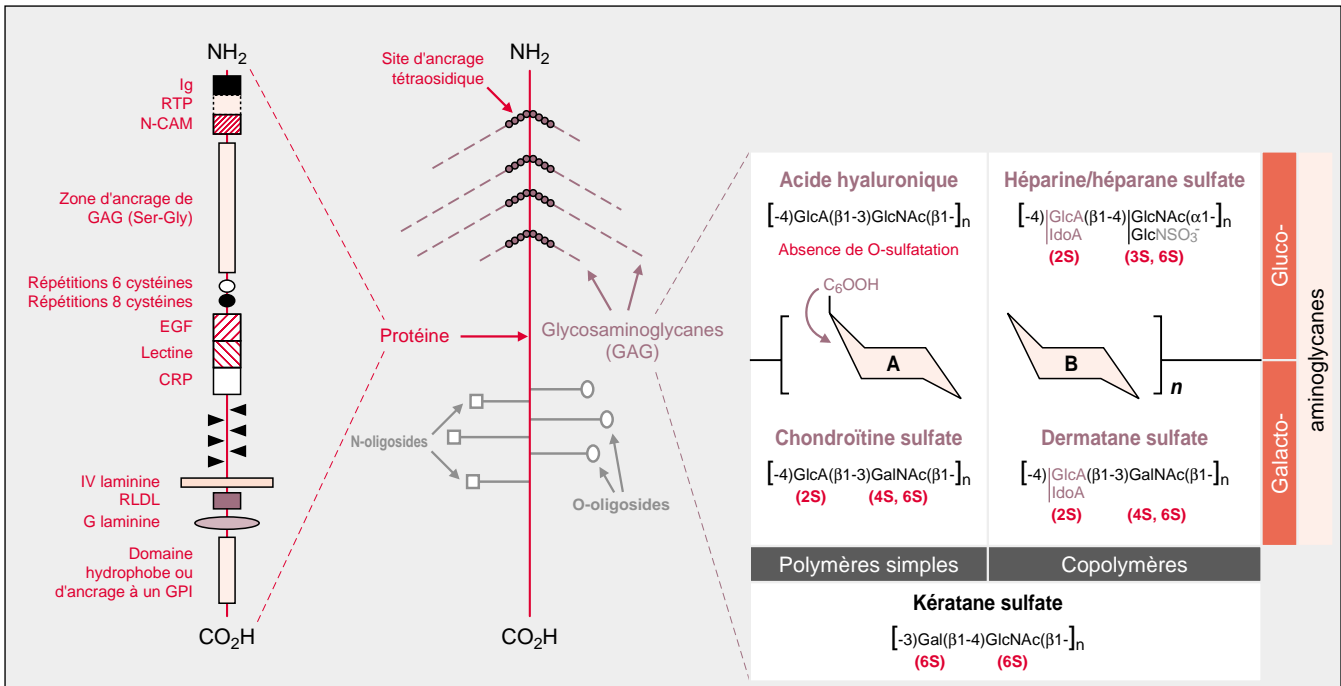


Figure 1. **Structure du protéoglycane «imagicane».** Au centre de la figure est représentée la structure en « arbre » d'un protéoglycane. Sur un tronc protéique central appelé core protein sont greffées de manière covalente des chaînes de glycosaminoglycannes (GAG). Ces deux constituants présentent une très grande variabilité structurale d'un protéoglycane à l'autre. À gauche est schématisée la structure modulaire d'une core protein imaginaire avec juxtaposition de motifs de localisation cellulaire (portion hydrophobe, site d'attachement à un glycosylphosphatidylinositol -GPI- membranaire), de motifs d'ancrage de glycoconjugués (O- et N-liés) identiques à ceux présents dans les glycoprotéines, et enfin de motifs conservés au cours de l'évolution de type Ig (immunoglobuline), N-CAM (neural cell adhesion molecule), EGF (epidermal growth factor), lectine, CRP (complement regulatory protein), laminine (domaine G ou sous-domaine IV) ou encore LDL (récepteur des LDL). Certains motifs sont beaucoup plus spécifiques des protéoglycannes. Il peut s'agir de répétitions de 6 ou 8 cystéines, de répétitions de deux boucles en tandem stabilisées par des ponts disulfures (domaine « RTP » pour répétition en tandem des protéoglycannes), ou encore de consensus sérine-glycine servant de sites d'ancrage pour les chaînes de GAG. À droite de la figure est détaillée la structure des GAG. Ce sont des chaînes polyosidiques sulfatées linéaires formées d'unités diholosidiques répétées. La répétition diholosidique des GAG comprend toujours un acide hexuronique (A) et une hexosamine (B). Il existe deux épimères possibles pour l'acide hexuronique (UA) : soit l'acide glucuronique (GlcA), soit l'acide iduronique (IdoA) selon la position du groupement C<sub>6</sub>OOH respectivement en dessus ou en dessous du cycle. On distingue les polymères simples ne présentant que des résidus de GlcA le long de leur chaîne (acide hyaluronique, chondroïtine sulfate) des copolymères possédant à la fois des résidus de GlcA et d'IdoA (héparine, héparane sulfate et dermatane sulfates). Quant à l'hexosamine, il peut s'agir de la glucosamine (GlcN), de la galactosamine (GalN) ou de leurs dérivés N-acétylés (GlcNAc et GalNAc, respectivement). Cela permet un autre type de classification des GAG distinguant les glucosaminoglycannes de structure [UA-GlcN]<sub>n</sub> tels que l'acide hyaluronique, l'héparine et l'héparane sulfate, des galactosaminoglycannes [UA-GalN]<sub>n</sub> tels que les chondroïtines sulfate et le dermatane sulfate. Les deux oses constitutifs de chaque GAG sont sujets à de multiples modifications biochimiques. Sur le schéma sont représentées l'épimérisation déjà citée (en rose), la N-désacétylation suivie d'une N-sulfatation (en gris), et enfin de multiples O-sulfatations (en rouge). Le kératine sulfate échappe à la définition étroite d'un GAG car l'acide hexuronique est remplacé par du galactose (Gal) dans son motif de base. Néanmoins, à l'image des GAG précités, sa chaîne présente la structure répétitive [Gal-GlcNAc]<sub>n</sub>.

## Les protéoglycannes, de véritables « arbres » matriciels

Ces macromolécules ont, comme leur nom l'indique, une double nature biochimique (pour revue, voir [1, 2]). Sur un tronc protéique central appelé *core protein* sont greffées par covalence des branches poly-

osidiques appelées « glycosaminoglycannes » (GAG) (figure 1). Cette organisation originale en sapin permet de concilier, au sein d'une même molécule, une hétérogénéité structurale à la fois protéique et osidique. Chaque protéoglycane possède une protéine bien particulière. La caractérisation de ces protéines révèle une

structure modulaire avec une juxtaposition de différents motifs très conservés (figure 1) déterminant le profil de glycosylation, la localisation cellulaire et certaines capacités interactives du protéoglycane final. Les chaînes de GAG présentent également une très grande variabilité structurale. Ces molécules ont été

pendant longtemps désignées sous le terme de « mucopolysaccharides acides » en raison de leur forte capacité de rétention de l'eau (« muco »), de leur nature glucidique (« polysaccharides ») et de leur caractère acide provenant de leurs multiples charges négatives (« acides »). Il s'agit en effet de chaînes linéaires sulfatées composées de la répétition d'un diholoside de base contenant toujours une hexosamine (glucosamine (GlcN) ou galactosamine (GalN)) et un autre ose (acide glucuronique (GlcA), acide iduronique (IdoA), galactose (Gal)). La glucosamine est soit N-sulfatée (GlcNS), soit N-acétylée (GlcNAc). En revanche, la galactosamine est toujours N-acétylée (GalNAc). En outre, il peut y avoir des sulfates O-liés sur l'hexosamine, l'acide uronique et le galactose. Le fort caractère anionique des GAG s'explique par la présence de groupes carboxylate au sein des acides hexuroniques et de groupes sulfate O- et N-liés. Les principaux GAG sont l'acide hyaluronique (HA), l'héparane sulfate (HS), l'héparine (HP), la chondroïtine sulfate (CS), le dermatane sulfate (DS) et le kératane sulfate (KS) (figure 1).

La biosynthèse d'un protéoglycane débute par la formation de la protéine centrale. Un tétraholoside particulier (GlcA-Gal-Gal-Xyl) est ensuite greffé sur certaines des sérines de la protéine par liaison entre le xylose et la fonction hydroxyle de ces sérines. Les chaînes de GAG sont ensuite polymérisées à partir de ces structures d'ancrage. La synthèse des GAG nécessite l'action coordonnée et concertée d'enzymes très spécifiques (transférases, épimérasas, sulfotransférases) adjacentes dans la membrane du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi [3]. La synthèse commence par un ajout successif alterné de deux précurseurs activés (UDP-GlcA et UDP-GlcNAc pour HA, HS et HP; UDP-GlcA et UDP-GalNAc pour CS et DS; UDP-Gal et UDP-GlcNAc pour KS). Puis, une multitude de réactions biochimiques (N-désacétylation, N- et O-sulfatations, épimérisation) modifient les deux oses constitutifs du motif de base et cela de manière hétérogène le long de la chaîne. D'une chaîne d'héparane sulfate à

l'autre par exemple, le rapport acide glucuronique/acide iduronique, la nature, le nombre et la position des O-sulfatations, ainsi que le rapport N-sulfate/O-sulfate peuvent varier, ce qui, potentiellement, offre une immense diversité structurale (pour revue, voir [4, 5]). Les protéoglycans se distinguent les uns des autres par la séquence de la protéine ainsi que par le type, le profil de modification biochimique, le nombre et la longueur des GAG liés. La dégradation des protéoglycans fait appel à des enzymes extracellulaires (métalloprotéases, cathepsines pour la protéine; endoglycosidases, exoglycosidases, exosulfatases pour les GAG) ainsi qu'à des enzymes lysosomales qui terminent le découpage à l'intérieur de la cellule.

De nombreuses techniques sont actuellement disponibles pour étudier les protéoglycans. Leur localisation peut être appréhendée à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de la partie protéique ou glucidique. De manière beaucoup moins spécifique, des colorants cationiques (rouge de ruthénium, bleu cuprolinique) mettent en évidence des protéoglycans portant une certaine catégorie de GAG. Les techniques classiques de la biologie moléculaire (clonage, séquençage, comparaisons de séquences, mutagenèse dirigée, hybridation *in situ*, extraction d'ARNm) et de biochimie (extraction, purification) sont exploitées pour caractériser la partie protéique des protéoglycans. En revanche, il est pour l'instant difficile de séquencer directement les chaînes osidiques. Pour contourner cet handicap, certains auteurs ont mis au point la « cartographie oligosaccharidique ». Cette technique repose sur l'analyse des profils de coupe des GAG par des agents chimiques et enzymatiques spécifiques [6]. La conformation des différents oses le long d'une chaîne de GAG ainsi que l'organisation spatiale des chaînes sont appréhendées par des techniques physiques plus lourdes (résonance magnétique nucléaire, dichroïsme circulaire, diffraction des rayons X...).

L'exploration actuelle des protéoglycans est donc le résultat d'une complémentarité originale entre des approches de nature très variée.

## Les principaux protéoglycans

En raison de la grande variabilité structurale engendrée au cours de la biosynthèse des protéoglycans, il est difficile d'envisager une quelconque classification de ces molécules en fonction de la nature de leur protéine ou de leurs chaînes de GAG greffées. Une des propriétés des protéoglycans est leur capacité de présenter une localisation à la fois extracellulaire, membranaire et intracellulaire (pour revue, voir [7]). Cela fournit un premier moyen simple de les classer.

Les protéoglycans extracellulaires, dits communément interstitiels, sont pour la plupart des protéoglycans à chondroïtine/dermatane sulfate. Il est classique de les subdiviser en deux catégories en fonction de leur taille. Le premier groupe comporte des protéoglycans de grande taille capables de former des édifices supramoléculaires avec l'acide hyaluronique (voir figure 1 de la partie II de cet article, p. 422). C'est le cas notamment de l'agrécane dans le cartilage et du versicane dans la paroi des vaisseaux sanguins (Tableau I). Le deuxième groupe comprend des protéoglycans de petite taille caractérisés par une protéine possédant des séquences riches en leucine répétées 7 à 24 fois. Citons dans cette catégorie la décorine, ubiquitaire, et le lumécane, présent dans la cornée. En parallèle avec ces protéoglycans à chondroïtine/dermatane sulfate, il existe un petit nombre de protéoglycans matriciels à héparane sulfate. C'est le cas par exemple du perlécane, constituant essentiel des lames basales (Tableau I) [8].

La subdivision des protéoglycans membranaires repose non pas sur la taille, mais sur le type d'association de ces protéoglycans avec la membrane. Il peut s'agir d'une liaison à un glycosylphosphatidylinositol (glypicane, cérébroglycane) ou d'une intercalation hydrophobe (les quatre membres de la famille des syndécans, le bêtaglycane). De par leur position membranaire, ces protéoglycans peuvent jouer le rôle de transducteurs de signaux extracellulaires à l'intérieur des cellules, un peu à l'image des intégrines (Tableau I). En outre, leur partie extracellulaire peut être détachée pour acheminer à dis-

tance une information de type soluble. Enfin, il existe des protéoglycane intracellulaires tels que la serglycine présente dans les granules de sécrétion des mastocytes (*Tableau I*).

### **Les protéoglycane, carrefours d'interactions**

La double nature biochimique des protéoglycane permet la constitution de sites particuliers protéiques et osidiques (pour revue, voir [9]). Ces sites peuvent être impliqués dans des interactions avec d'autres composants matriciels tels que les collagènes. Ainsi, certains petits protéoglycane interstitiels tels que la décorine contrôlent la fibrillogenèse du collagène et interviennent par conséquent sur l'assemblage matriciel [10]. Les protéoglycane peuvent aussi fixer certaines cytokines et régler leur activité, leur biodisponibilité et leur stabilité (pour revue, voir [11]). Ce phénomène appelé « crinopexie » [12] a été particulièrement étudié dans le cas des FGF (*fibroblast growth factors*) interagissant avec des protéoglycane à héparane sulfate [13]. Cette interaction permet aux protéoglycane de régler étroitement la prolifération et la différenciation cellulaire (*Tableau I*). La crinopexie est elle-même sujette à des mécanismes de régulation. L'interféron-gamma (IFN $\gamma$ ) par exemple module la synthèse, la structure, et la répartition tissulaire des glycosaminoglycane [14-16]. Par ce biais, l'IFN $\gamma$  pourrait modifier la crinopexie d'autres cytokines, ajoutant ainsi un mécanisme supplémentaire de régulation au sein du réseau déjà fort complexe des cytokines. Enfin, les protéoglycane peuvent également interagir et moduler l'activité de certaines enzymes (protéases mastocytaires, lipoprotéine lipase) et d'inhibiteurs de protéases à sérine (antithrombine III, co-facteur II de l'héparine).

Au niveau du protéoglycane, l'interaction avec une molécule cible met en jeu un site protéique (cas de l'interaction *transforming growth factor*  $\beta$ /décorine) ou osidique (cas des interactions *basic fibroblast growth factor*/syndécane ou IFN $\gamma$ /perlécane). Généralement, ces sites osidiques sont peu spécifiques et simplement électronégatifs pour interagir avec des acides aminés basiques de la protéine cible. C'est le cas par exemple

de l'interaction entre certains protéoglycane à héparane sulfate et le collagène de type V [17]. Cependant, certaines interactions impliquent parfois des séquences osidiques très précises de forte affinité et de grande spécificité pour la molécule cible. Nous détaillerons par la suite l'exemple du site pentaosidique de fixation de l'ATIII au sein de l'héparine. Enfin, il reste à noter qu'un protéoglycane donné sera plus ou moins interactif en fonction du profil de modification chimique de ses chaînes de GAG. Les co-polymères (*figure 1*) par exemple (héparine, héparane sulfate, dermatane sulfate) possèdent des résidus d'iduronate présentant une très grande flexibilité conformationnelle [18]. Cette liberté d'orientation spatiale leur permet de s'auto-associer [19] et d'interagir avec de multiples molécules extracellulaires et cellulaires, à la différence des polymères simples (acide hyaluronique, chondroïtine sulfate, kératane sulfate) [20].

### **Les protéoglycane, molécules thérapeutiques**

Certaines propriétés interactives et régulatrices des protéoglycane peuvent être exploitées en thérapeutique. C'est le cas par exemple de l'activité anticoagulante de l'héparine. En outre, le fait que certains protéoglycane régulent des cytokines par crinopexie ouvre un champ d'application potentiel de ces macromolécules en tant que moyens de stockage de médiateurs solubles.

#### **Héparine anticoagulante**

Les maladies thrombotiques (complications cardiovasculaires de l'athérosclérose notamment) constituent une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. Quarante-vingts ans après sa découverte, l'héparine suscite toujours autant d'intérêt en raison de ses propriétés anticoagulantes. L'héparine standard (dite encore héparine non fractionnée ou HNF) utilisée dans les premiers traitements était extraite d'intestin ou de poumons de bovins. Ces deux tissus possèdent en effet de nombreux mastocytes riches en un protéoglycane appelé serglycine portant des chaînes d'héparine

(*Tableau I*). Pour réduire le risque hémorragique et assurer une meilleure reproductibilité thérapeutique, l'héparine standard a été fractionnée après coupure chimique ou digestion enzymatique pour donner les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) [21]. Par rapport à l'HNF, ces HBPM permettent de garder une activité antithrombotique tout en réduisant le risque hémorragique. Le mode d'action de l'héparine, ou de ses fragments, dans la cascade de coagulation n'a été compris que récemment. L'héparine se lie à l'antithrombine III (ATIII), induit un changement conformationnel dans cet inhibiteur de protéases à sérine (« serpine »), ce qui le rend plus réactif vis-à-vis de ses protéases cibles telles que la thrombine. On estime que l'association héparine/ATIII accélère d'un facteur 1000 la formation du complexe ATIII/thrombine. D'autres facteurs hémostatiques purifiés de la voie intrinsèque de la coagulation (IXa, Xa, XIa, XIIa) sont à un moindre degré également neutralisés par l'ATIII de manière dépendante de l'héparine. *In vivo*, il est vraisemblable que le GAG anticoagulant physiologique ne soit pas l'héparine mais plutôt l'héparane sulfate présent à la surface des cellules endothéliales vasculaires [22]. L'héparane sulfate diffère de l'héparine par une répartition tissulaire ubiquitaire et par un moindre degré de sulfatation (*figure 1*). De nombreuses équipes de recherche ont essayé de purifier le « principe actif » de l'héparine et de l'héparane sulfate. Ces travaux ont abouti à la caractérisation d'un pentaholoside [23]. Ce motif osidique possède des résidus de glucosamine 3-O-sulfatée et 6-O-sulfatée fondamentaux pour assurer une fixation spécifique de résidus lysine, arginine et probablement histidine de l'ATIII. Des études cliniques chez l'homme [24] montrent que cet oligoside présente trois propriétés intéressantes. Son activité spécifique antithrombotique est très importante (700 U antifacteur Xa/mg) sa demi-vie est trois à quatre fois plus longue par rapport aux HBPM, enfin, comme les HBPM, ce pentaholoside est dépourvu d'activité antithrombotique ce qui réduit considérablement le risque hémorragique au cours des traitements.

Tableau I

## PRINCIPAUX PROTÉOGLYCANES CONNUS, CLASSÉS PAR LOCALISATION CELLULAIRE

Groupe de PG	Nom	Origine du nom	Protéine cœur	GAG	Localisation	Interactions	Fonctions
<b>PG extra-cellulaires</b>	<b>Agrécane (PG-H)</b>	Forme des agrégats avec l'HA	220 kDa Trois domaines globulaires G1, G2 et G3	100 chaînes CS (20-30 kDa) + 100 chaînes de KS (10-15 kDa) 90% de la masse du PG	Cartilage. Tendon sclérotique (50 mg d'agrégats par g de tissu) sous forme d'agrégats avec l'HLA	Protéine de liaison HA	Hydratation (10 ml/g de tissu sec) et résistance aux forces compressives du cartilage
<b>PG formant des agrégats interstitiels</b>	<b>Versicane (PG-400)</b>	Structure « versatile », complexe	265 kDa Domaines G1 et G3 de l'agrécane	Beaucoup moins de chaînes que l'agrécane (15-20 chaînes de CS/DS)	Fibroblastes humains (peau et vaisseaux sanguins)	Protéine de liaison HA	Résistance des vaisseaux sanguins aux forces compressives pulsatiles
	<b>Neurocane</b>	tissu nerveux	139 kDa	CS	Tissu nerveux	Protéine de liaison HA	Connexion entre les neurones et l'HA. Migration des axones dans le système nerveux central
	<b>Brévican</b>	Structure « brève », courte	99 kDa	CS ou aucun GAG ( <i>part-time</i> PG)	Tissu nerveux	Protéine de liaison HA	?
<b>Petits PG interstitiels à protéine riche en leucine</b>	<b>Décorine (PS-S2, PG-II, PG-40)</b>	Décore les fibrilles de collagène	40 kDa Répétitions riches en leucine	1 seule chaîne de CS ou DS	Ubiquitaire	Collagènes I, II et III (bandes « d » et « e »), V, VI, XV TGFβ	Fibrillogenèse du collagène Modulation du TGFβ
	<b>Biglycane (PG-S1, PG-I)</b>	Possède deux chaînes de GAG	Mêmes caractéristiques que la décorine	2 chaînes de CS ou DS	Ubiquitaire	Collagènes I (bandes « d » et « e ») TGFβ	Fibrillogenèse du collagène Modulation du TGFβ
	<b>Fibro-moduline</b>	Module la fibrillogenèse du collagène	Mêmes caractéristiques que la décorine	4 chaînes de KS	Tendon, cartilage et cornée	Collagènes (bandes « a » et « c »)	Fibrillogenèse du collagène
	<b>Lumicane</b>	Responsable de la transparence cornéenne	Mêmes caractéristiques que la décorine	Plusieurs chaînes de KS (en moyenne 4)	Cornée, valves cardiaques	Collagènes	Transparence de la cornée
<b>PG des lames basales</b>	<b>Perlécane</b>	Aspect d'un collier de perles	400 kDa Nombreux modules protéiques conservés au cours de l'évolution	3-4 chaînes d'HS ou d'HS + DS sur l'extrémité amino-terminale	Lames basales	Lui-même Laminine Collagène type IV	Perméabilité sélective Ancrage de l'acétylcholinestérase au niveau de la jonction neuromusculaire
	<b>HSPG autres (voisins du perlécane)</b>	Idem	Idem	Idem	Membrane glomérulaire	Laminine Collagène type IV	Barrière anionique pour les protéines sériques

Tableau I (suite)

Groupe de PG	Nom	Origine du nom	Protéine cœur	GAG	Localisation	Interactions	Fonctions
<b>PG membranaires</b>	<b>Syndécane (4 membres)</b>	Du grec <i>syndein</i> « maintenir ensemble » car ce protéoglycane lie les molécules de la matrice extracellulaire au cytosquelette	Un même domaine intracellulaire et un même domaine hydrophobe transmembranaire. Se différencient par leur partie extracellulaire	Profil de glycosylation spécifique de chaque type de syndécane	Localisation spécifique de chaque type de syndécane	Protéines du cytosquelette (actine...) Cytokines bFGF, IFN $\gamma$ ) Autres composants matriciels (collagènes I, III, V; fibronectine) Enzymes Inhibiteurs de protéases (ATIII) Virus (HIV, HSV)	Pontage entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette Régulation de la bio-disponibilité, de la stabilité et de l'activité de cytokines Contrôle de l'entrée de certains virus dans leurs cellules cibles
<b>Ancrage hydrophobe</b>	syndécane-1	Idem	31 kDa	3-4 chaînes d'HS et 2 chaînes de CS/DS	Cellules épithéliales	Idem	Idem
	syndécane-2 fibroglycane	A la surface de fibroblastes	20 kDa	3-4 chaînes d'HS	Fibroblastes	Idem	Idem
	syndécane-3 N-syndécane	N pour <i>Neural</i>	38 kDa	3-4 chaînes d'HS	Tissu nerveux Mésoenchyme au cours du développement	Idem	Idem
	syndécane-4 amphiglycane ou ryudocane	Conjugué les autres syndécane	20 kDa	3-4 chaînes d'HS	Fibroblastes cellules épithéliales	Idem	Idem
	$\beta$ -Glycane	Se lie au TGF $\beta$	92 kDa N-terminal voir endogline C-terminal voir uromoduline	2 chaînes d'HS et CS	Ubiquitaire	TGF $\beta$	Récepteur de type III du TGF $\beta$ , activateur (membranaire) ou inhibiteur (soluble) de la fixation de cette cytokine sur ses récepteurs protéiques de types I et II
<b>Ancrage par un GPI</b>	<b>Cérébroglycane</b>	Localisation uniquement cérébrale	59 kDa Site de liaison au GPI	5 sites potentiels d'attachement de chaînes d'HS	Système nerveux central	?	Aide à la migration des neurones au cours du développement
	<b>Glypicane</b>	Ancrage membranaire par un GPI	64 kDa Site de liaison au GPI	4 chaînes d'HS	Ubiquitaire	?	Idem
<b>PG intracellulaires</b>	<b>Serglycine</b>	Répétitions (Ser-Gly) dans sa protéine cœur	10-15 kDa la plus courte 24 répétitions de Ser-Gly	10-15 chaînes – d'HP dans les mastocytes mûrs des tissus conjonctifs – de CS très sulfaté dans les mastocytes circulants	Granule intracellulaire des cellules hématopoïétiques et mastocytaires	Protéases carboxy-peptidases, histamines dans les granules de stockage des mastocytes	Stockage, relargage lent et contrôle de l'activité des médiateurs mastocytaires

PG : protéoglycane; GAG : glycosaminoglycane; HA : acide hyaluronique; HSPG : héparane sulfate protéoglycane; CS : chondroïtine sulfate; KS : kératane sulfate; DS : dermatane sulfate; TGF $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$ .

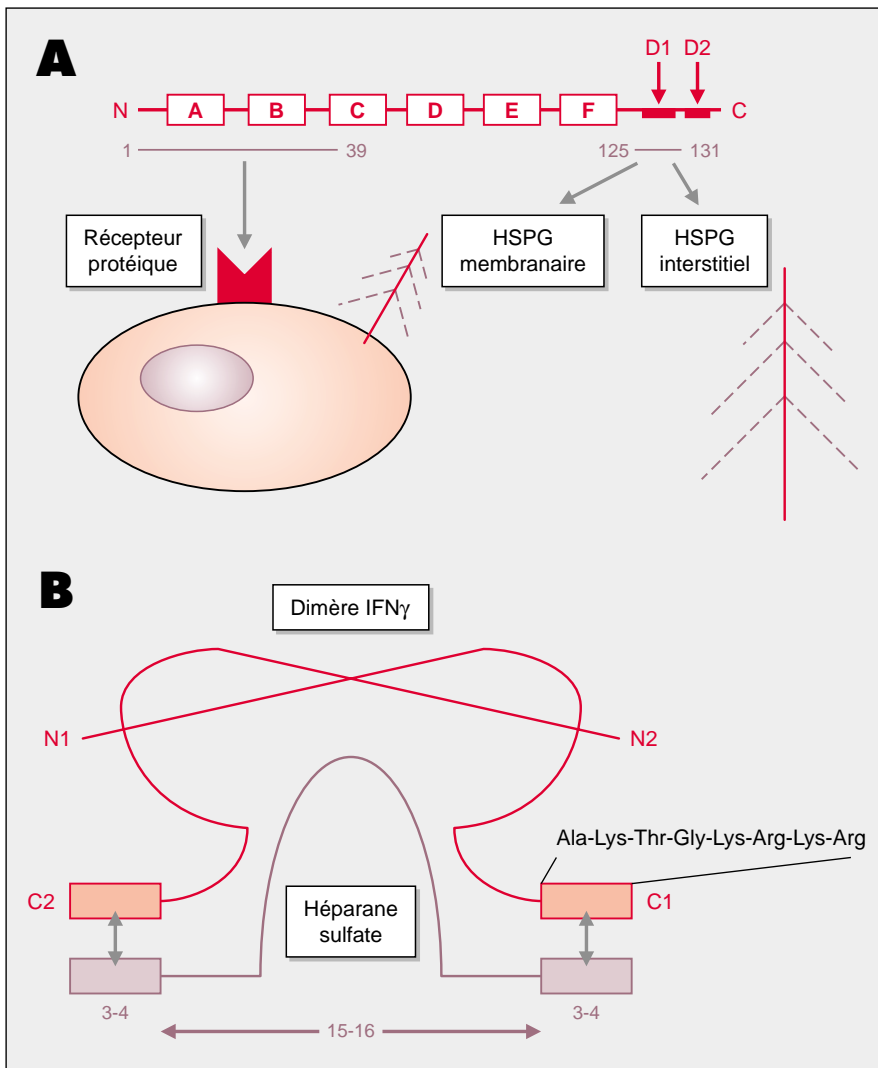


Figure 2. **L'interaction IFN $\gamma$ /héparane sulfate.** **A.** Zones d'interaction de l'IFN $\gamma$  avec ses différents récepteurs. La cytokine présente dans sa partie amino-terminale (N) un site de fixation pour son récepteur protéique, et dans sa partie carboxy-terminale (C) une région présentant une forte affinité pour des héparane sulfates interstitiels ou membranaires. Au niveau de cette région carboxy-terminale, deux domaines (D1 et D2) sont particulièrement sensibles à des coupures protéolytiques. L'activité de l'IFN $\gamma$  est potentialisée si moins de 10 acides aminés sont clivés (D2). En revanche, une baisse d'activité est observée si 14 acides aminés sont enlevés (D1+D2). L'héparane sulfate protège le domaine D1 d'une dégradation protéolytique et potentialise ainsi l'activité de la cytokine. **B.** Modèle pour l'interaction IFN $\gamma$ /héparane sulfate. Le site glucidique de l'héparane sulfate comprend deux courts domaines N-sulfatés (d'environ 3-4 diholosides chacun) reliés par un long domaine N-acétylé enrichi en résidus de GlcA (d'environ 15-16 diholosides de long). Le site protéique de la partie carboxy-terminale de l'IFN $\gamma$  contient une séquence riche en acides aminés basiques (Ala-Lys-Thr-Gly-Lys-Arg-Lys-Arg). Dans l'association cytokine/GAG, les extrémités carboxy-terminales des deux monomères constitutifs de l'IFN $\gamma$  interagiraient avec les deux domaines glucidiques sulfatés de l'héparane sulfate, le domaine N-acétylé servant de pontage central.

Mise à part l'héparine, d'autres GAG sont en phase d'étude pour leurs propriétés anticoagulantes. Par exemple le dermatane sulfate, pour son action sur le co-facteur II de l'héparine [25].

### Protéoglycanes et crinopexie

Certains protéoglycanes sont capables de neutraliser l'activité de cytokines par crinopexie [12]. Ce concept a été découvert de manière assez fortuite. En effet, il avait été observé qu'une surexpression de décorine dans des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) conduisait à une modification importante de leur morphologie et de leur croissance [26]. Cette transformation provient d'une liaison entre la protéine de la décorine et un facteur autocrine des cellules CHO, le TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ),

et conduit à la neutralisation de l'action proliférative du TGF $\beta$ . Cette interaction décorine/TGF $\beta$  a été mise à profit dans un modèle de glomérulonéphrite expérimentale chez le rat au cours duquel l'administration de décorine peut inhiber l'action fibrogénique du TGF $\beta$  *in vivo* et atténuer les symptômes cliniques observés [27]. Ainsi, l'association TGF $\beta$ /décorine tamponnerait l'activité toxique de la cytokine lorsque celle-ci est à trop forte concentration. Cet effet est renforcé par le fait que le TGF $\beta$  augmente par un rétrocontrôle positif la synthèse de décorine (pour revue, voir [28]).

Au lieu d'être neutralisées, certaines cytokines, comme l'IFN $\gamma$ , sont protégées et leur activité est même potentialisée par les protéoglycanes. L'IFN $\gamma$  est une cytokine de 143 acides aminés. Cristallisé, l'IFN $\gamma$  humain recombi-

nant se présente sous la forme d'un homodimère de 34 kDa. L'IFN $\gamma$  est essentiellement sécrété par les lymphocytes T. Il intervient au cours de l'inflammation et pratiquement à tous les stades de la réponse immune (activation des macrophages, expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T, modulation de la réponse lymphocytaire B...). L'IFN $\gamma$  est aussi antiviral, cytotatique, et participe à la régulation d'un grand nombre de molécules d'adhérence. Il joue donc un rôle important dans les mécanismes de défense, de croissance et de différenciation cellulaire, ainsi que dans le contrôle des interactions cellules/matrice extracellulaire (pour revue, voir [29]). Ces activités, extrêmement variées, sont transmises aux cellules par un récepteur protéique trans-

membranaire, présent à la surface de nombreuses cellules. Cette distribution ubiquitaire du récepteur, de même que le caractère pléiotrope de l'IFN $\gamma$ , suggèrent l'existence de mécanismes extracellulaires de régulation de la cytokine [30-32].

Une des composantes de cette régulation fait intervenir des protéoglycannes à héparane sulfate capables de fixer avec une forte affinité l'IFN $\gamma$  [32]. Le domaine par lequel l'IFN $\gamma$  se fixe sur les héparane sulfates se situe dans l'extrémité carboxy-terminale de la cytokine, et consiste en de courtes séquences riches en acides aminés basiques [33] (figures 2A, 2B). L'intégrité de cette séquence est indispensable à l'activité de l'IFN $\gamma$ . *In vivo*, l'IFN $\gamma$  non complexé à des molécules d'héparane sulfate ou d'héparine subit une série de coupures protéolytiques sur son extrémité carboxy-terminale, ce qui réduit très considérablement son activité biologique. L'utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant précisément des épitopes contigus localisés dans l'extrémité carboxy-terminale de l'IFN $\gamma$  a permis de montrer que l'interaction IFN $\gamma$ /héparine limitait l'étendue des coupures protéolytiques dans cette partie de la cytokine, ce qui avait pour effet d'augmenter son activité [34] (figure 2A). Enfin, *in vivo*, dans un modèle de fibrose hépatique (bilharziose murine à *Schistosoma mansoni*), nous avons pu observer que le traitement par l'IFN $\gamma$  ne produisait pas un effet homogène dans le foie de souris infectées [35]. En effet, cette cytokine diminue de 75 % le dépôt collagénique présent dans le parenchyme hépatique (fibrose dissienne) tout en n'exerçant aucun effet sur le dépôt collagénique du granulome (fibrose péri-ovulaire). En parallèle, nous avons pu observer que les molécules d'héparane sulfate étaient présentes dans le parenchyme hépatique, mais absentes du granulome bilharzien [14]. L'héparine/héparane sulfate module donc l'activité biologique de l'IFN $\gamma$  en modifiant l'étendue de coupures protéolytiques sur son extrémité carboxy-terminale [34], et en gérant sa répartition tissulaire [36]. Ce phénomène représente un nouveau mécanisme de régulation de l'activité d'une cytokine par un glycosaminoglycane. Par ailleurs, la

connaissance du site de fixation de l'IFN $\gamma$  sur les héparane sulfates [37] (figure 2B) devrait permettre de préparer différents types d'oligosides ayant une forte affinité et une bonne spécificité pour l'IFN $\gamma$ . L'obtention d'oligosides de structures bien définies, fixant l'IFN $\gamma$  avec les mêmes propriétés que l'héparine ou l'héparane sulfate, permettrait de moduler l'activité, la toxicité et le ciblage tissulaire de la cytokine tout en s'affranchissant des activités anticoagulantes de l'héparine [38] ■

## RÉFÉRENCES

1. Wight TN, Heinegård DK, Hascall VC. Proteoglycans: structure and function. In: Hay ED, ed. *Cell biology of extracellular matrix*, 2nd ed. New York: Plenum Press, 1991: 45-71.
2. Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 443-75.
3. Silbert JE, Suguraman G. Intracellular membranes in the synthesis, transport, and metabolism of proteoglycans. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241: 371-84.
4. Gallagher JT, Turnbull JE, Lyon M. Patterns of sulphation in heparan sulphate: polymorphism based on a common structural theme. *Int J Biochem* 1992; 24: 553-60.
5. Salmivirta M, Lidholt K, Lindahl U. Heparan sulfate: a piece of information. *FASEB J* 1996; 10: 1270-9.
6. Turnbull JE. Oligosaccharide mapping and sequence analysis of glycosaminoglycans. In: Graham JM, Higgins JA, eds. *Biomembrane protocols I. Series: methods in molecular biology* 19. Totowa: Humana Press, 1993: 253-67.
7. Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4: 229-55.
8. Giry-Lozique C, Kleman J, Van der Rest M. Interactions moléculaires et modularité des protéines au sein des matrices extracellulaires. *Med Sci* 1994; 10: 1234-43.
9. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 1991; 71: 481-539.
10. Schönherr E, Hausser H, Beavan L, Kresse H. Decorin-type I collagen interaction: presence of separate core protein-binding domains. *J Biol Chem* 1995; 270: 8877-83.
11. Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991; 113: 981-6.
12. Feige JJ, Baird A. La crinopexie: un modèle décrivant les mécanismes qui régissent la biodisponibilité des facteurs de croissance. *Med Sci* 1992; 8: 805-10.
13. Blanquet P. Les signaux des FGF: un mécanisme qui commence à être déchiffré. *Med Sci* 1996; 12: 303-12.
14. Praillet C, Lortat-Jacob H, Baltzer F, Grimaud JA. Distribution of hepatic glycosaminoglycans during acute schistosomiasis: modulation by IFN $\gamma$  treatment. *Cell Mol Biol* 1996; 42: 167-77.
15. Praillet C, Lortat-Jacob H, Grimaud JA. Interferon- $\gamma$  inhibits  $^{35}$ S incorporation in heparan sulfate synthesized by human skin fibroblasts. *FEBS Lett* 1996; 387: 109-12.
16. Praillet C, Lortat-Jacob H, Grimaud JA. Interferon  $\gamma$  differentially affects the synthesis of chondroitin/dermatan sulphate and heparan sulphate by human skin fibroblasts. *Biochem J* 1996; 318: 863-70.
17. Lebaron RG, Höök A, Esko JD, Gay S, Höök M. Binding of heparan sulfate to type V collagen. A mechanism of cell-substrate adhesion. *J Biol Chem* 1989; 264: 7950-6.
18. Venkataraman G, Sasisekharan V, Cooney CL, Langer R, Sasisekharan R. A stereochemical approach to pyranose ring flexibility: its implications for the conformation of dermatan sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6171-5.
19. Scott JE. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, *in vitro* and in tissues. *FASEB J* 1992; 6: 2639-45.
20. Casu B, Petitou M, Provasoli M, Sinaÿ P. Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. *Trends Biochem Sci* 1988; 13: 221-5.
21. Pouzol P, Polack B. Les héparines de bas poids moléculaire. Quelle surveillance biologique? *Techn Biol* 1987; 2: 46-50.
22. Marcum JA, McKenney JB, Rosenberg RD. Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters *via* heparin like molecules bound to the endothelium. *J Clin Invest* 1984; 74: 341-50.
23. Petitou M, Duchaussoy P, Lederman I, Choay J, Sinaÿ P. 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* 1988; 179: 163-72.
24. Boneu B, Necciari J, Cariou R, Sié P, Gabaig AM, Kieffer G, Dickinson J, Lamond G, Moelker H, Mant T, Magnani H. Pharmacokinetics and tolerance of the natural pentasaccharide (SR90107/ORG31540) with high affinity to antithrombin III in man. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1468-73.
25. Linhardt RJ, Hileman RE. Dermatan sulfate as a potential therapeutic agent. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 443-51.
26. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- $\beta$  by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990; 346: 281-4.
27. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992; 360: 361-4.



## RÉFÉRENCES

28. Ruoslahti E, Yamaguchi Y, Hildebrand A, Border WA. Extracellular matrix/Growth factor interactions. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1992; LVII: 309-15.
29. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 571-611.
30. Lortat-Jacob H, Grimaud JA. Interferon-gamma C-terminal function: new working hypothesis. Heparan sulfate and heparin, new targets for IFN-gamma, protect, relax the cytokine and regulate its activity. *Cell Mol Biol* 1991; 37: 253-60.
31. Lortat-Jacob H, Grimaud JA. La matrice extracellulaire: du tissu de soutien à la régulation des cytokines. *Pathol Biol* 1994; 42: 612-20.
32. Lortat-Jacob H, Kleinman HK, Grimaud JA. High-affinity binding of interferon- $\gamma$  to a basement membrane complex (matrigel). *J Clin Invest* 1991; 87: 878-83.
33. Lortat-Jacob H, Grimaud JA. Interferon- $\gamma$  binds to heparan sulfate by a cluster of amino acids located in the C-terminal part of the molecule. *FEBS Lett* 1991; 280: 152-4.
34. Lortat-Jacob H, Baltzer F, Grimaud JA. Heparin decreases the blood clearance of interferon-gamma and increases its activity by limiting the processing of its C-terminal sequence. *J Biol Chem* 1996; 271: 16139-43.
35. Lortat-Jacob H, Baltzer F, Desmoulière A, Peyrol S, Grimaud JA. Lobular – but not periovular inhibition of collagen deposition in the liver of *Schistosoma mansoni* infected mice using IFN $\gamma$ . *J Hepatol* 1997; 26: 894-903.
36. Lortat-Jacob H, Brisson C, Guerret S, Morel G. Non-receptor-mediated tissular localization of human interferon- $\gamma$ : role of heparan sulfate/heparin-like molecules. *Cytokine* 1996; 8: 557-66.
37. Lortat-Jacob H, Turnbull JE, Grimaud JA. Molecular organization of the interferon  $\gamma$  – binding domain in heparan sulfate. *Biochem J* 1995; 310: 497-505.
38. Lortat-Jacob H. Agent potentialisateur d'interféron-gamma. Brevet n° 95 08723.

## TIRÉS À PART

J.A. Grimaud.

## Summary

### Proteoglycans as therapeutic agents (I)

Proteoglycans are macromolecules which consist of a protein backbone (the core protein) to which polysaccharidic chains called glycosaminoglycans are covalently linked. Proteoglycans are mainly found in the extracellular matrix, but also occur intracellularly and on cell surface membranes. The structural diversity of proteoglycans permits the constitution of proteic and/or saccharidic sites capable of interacting with other matricial components, cellular molecules and soluble mediators. This great ability to interact with other molecules allows proteoglycans to play a key role in matrix assembly. The strongly anionic nature of glycosaminoglycans provides hydration and swelling pressure to some tissues enabling them to withstand compressional forces (cartilage), to filtrate (renal glomerulus), or to be transparent (cornea). Proteoglycans also regulate a lot of cellular activities (adhesion, motility, proliferation, differentiation) and show some affinity for cytokines, controlling their availability, activity and stability by «crinopexy». Proteoglycans could also be exploited as therapeutic agents. This is the case of heparin, which has been used for a long time as an anticoagulant molecule. Moreover, the ability of proteoglycans to control cytokines by crinopexy suggests that they could function as reservoirs of soluble mediators, thus neutralizing toxic effects or potentiating desired activities in the treatment of different diseases.

# BIOTECHNOLOGIES 1998

Cours organisés par l'École de Médecine de Yale  
retransmis en direct aux dates indiquées  
à l'amphithéâtre Antoine-Lacassagne  
de l'Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75005 Paris, France

Academia and Biotech (7 avril 1998)  
(Drs S. McKnight, Southwestern Medical School, University of Texas)  
Synergy – Compatibility – Licensing

Conflicts of Interest (14 avril 1998)  
(M. C. Alexander, HHMI counsel)  
The relationship between a PI, the students, the funding agencies and a commercial enterprise

Starting and building a Biotech Company for the next decade (21 avril 1998)  
(M. M. Levin, CEO Millennium)  
Stratégies – Possibilities – Pitfalls

## Renseignements :

Pr Daniel Louvard, Institut Curie, Section recherche,  
26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France  
Tél. : 01 43 29 01 93 – Fax : 01 43 26 80 87