



HAL
open science

Interaction cytokines / glycosaminoglycanes comme cible d'une nouvelle approche thérapeutique

Mehdi Prull-Janssen

► **To cite this version:**

Mehdi Prull-Janssen. Interaction cytokines / glycosaminoglycanes comme cible d'une nouvelle approche thérapeutique. Médecine humaine et pathologie. Université d'Evry-Val d'Essonne, 2011. Français. NNT : 2011EVRY0017 . tel-04417321

HAL Id: tel-04417321

<https://theses.hal.science/tel-04417321>

Submitted on 25 Jan 2024

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.

Thèse de Doctorat de l'Université d'Evry-Val-d'Essonne

Ecole Doctorale des Génomes Aux Organismes

Spécialité : Spectrochimie Analytique

Présentée par

Mehdi PRULL-JANSSEN

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université d'Evry-Val-d'Essonne

**INTERACTION CYTOKINES /
GLYCOSAMINOGLYCANES COMME CIBLE D'UNE
NOUVELLE APPROCHE THERAPEUTIQUE**

Pr. Anne Varenne

Rapporteur

Pr. Nathalie Charnaux

Rapporteur

Pr. Jeanine Tortajada

Examineur

Dr. Régis Daniel

Examineur

Pr. Florence Gonnet

Examineur

A MA FAMILLE

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE - UMR 8587) à l'Université d'Evry-Val-d'Essonne, dirigé par le Pr. Jeanine Tortajada. Je la remercie vivement pour son accueil au sein de ce laboratoire.

Je remercie très sincèrement Nathalie Charnaux, Professeur à l'Université Paris 13 et Anne Varenne, Professeur à l'ENSCP, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Ce travail de thèse a été co-encadré par Florence Gonnet, Professeur à l'Université d'Evry-Val-d'Essonne, et Régis Daniel, Directeur de recherche au CNRS. Je les remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi et ce, depuis cinq ans (stage de Master et thèse). Je leur exprime ma gratitude pour leur encadrement et le partage de leurs connaissances scientifiques tout au long de ce travail. Je tiens à souligner leur courage pour la relecture et la correction de ce manuscrit de thèse.

Je remercie William Buchmann et Emmanuelle Léon, Maîtres de conférences à l'Université d'Evry-Val-d'Essonne, pour m'avoir accordé leur entière confiance, leurs connaissances et leur temps au cours de mon monitorat.

Je remercie également tous les membres du LAMBE avec qui j'ai apprécié travaillé pendant ces trois ans : Bernard, Cécile, Cédric, Delphine, Isabelle, Jean-Yves, Manue, Violette, Véronique et William.

Je remercie tout particulièrement Ketty, gestionnaire du LAMBE, pour son grand soutien pendant tous les moments, qu'ils aient été difficiles ou joyeux.

Je remercie les autres doctorants du LAMBE : Johana alias Mussoooooooooooooo ☺ et Daniel avec qui j'ai apprécié partager le bureau pendant tout ce temps. Merci à vous deux pour votre soutien, nos discussions scientifiques ou non, et surtout pour votre courage, car me supporter ce n'est pas tout les jours facile. Merci également à mes voisins de bureau : Isabelle, Julien, Pierre, Sarah, Véronique pour les midis passés ensemble dans la cafet'. Je n'oublierai pas Vanessa pour son soutien moral.

Je remercie les anciennes stagiaires du LAMBE (Annia, Imen, Kaina, Létitia, Manel et Nada) avec lesquelles j'ai apprécié travaillé. J'ai passé de très bons moments à rigoler avec les noms de code judicieusement trouvés pour certaines personnes. Etant top secret, aucun nom de code ne sera divulgué ☺.

Je remercie mes amis pour leur soutien qu'ils m'ont apporté durant ma thèse. Un grand merci à ma best Leila ou momie Suze (oups c'est écrit ☺) pour son soutien, son réconfort et nos délires. Merci également à Mathieu « genre quoi » pour son grand soutien moral ainsi que pour toutes les ballades du midi autour du lac.

Je remercie Martine, Odile et Jacky pour avoir accepté de relire mon manuscrit et d'y débusquer certaines coquilles glissées dans le manuscrit.

Je remercie de tout mon cœur l'ensemble de ma famille pour son soutien sans faille et en particulier mes parents et ma sœur pour m'avoir soutenu et cru en moi. Merci pour tout et merci d'être si fiers de moi.

TABLE DES MATIERES

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	16
INTRODUCTION GENERALE.....	23
CHAPITRE 1 : INTERACTION PROTEINES / POLYSACCHARIDES	27
I.A Rôles physiologiques et pathologiques des GAGs.....	29
I.A.1 Définition et structure des GAGs.....	29
I.A.1.1 Localisation des glycosaminoglycanes.....	29
I.A.1.2 Les glycosaminoglycanes	31
I.A.2 Fonctions biologiques des GAGs.....	35
I.A.2.1 Fonctions physiologiques	35
I.A.2.2 Mécanismes d'action des GAGs.....	37
I.A.2.3 Pathologies associées.....	41
I.A.3 Potentiel thérapeutique et mimétique des GAGs.....	43
I.A.4 Limites des connaissances et verrous analytiques.....	46
I.B Effets des GAGs sur la fonctionnalité des protéines	49
I.B.1 Interactions des GAGs avec les protéines cibles et leurs effets	49
I.B.2 Rôle du pH dans la liaison	53
I.B.3 Les chimiokines, des cytokines particulières interagissant avec les GAGs	54
I.B.3.1 La famille des chimiokines.....	57
I.B.3.2 L'interaction des chimiokines et des GAGs	73
I.B.3.3 Intérêt thérapeutique des chimiokines	76
I.B.3.4 Choix des cytokines et des chimiokines comme modèles d'études	77
CHAPITRE 2 : METHODES EXPERIMENTALES ET OPTIMISATION	99
II.A Méthodes utilisées pour étudier les interactions protéines/oligosaccharides	101
II.A.1 Techniques spectroscopiques.....	101
II.A.2 Calorimétrie	103
II.A.3 Méthodes hydrodynamiques	104
II.A.4 Mutagenèse dirigée	104

II.A.5	Puces à sucre.....	105
II.A.6	Modélisation moléculaire	105
II.B	L'électrophorèse capillaire	107
II.B.1	Injection des échantillons.....	108
II.B.2	Séparation	108
II.B.2.1	Mobilité électrophorétique.....	109
II.B.2.2	Mobilité électroosmotique	109
II.B.2.3	Mobilité apparente	111
II.B.3	Analyse des protéines par électrophorèse capillaire	111
II.B.3.1	Le tapissage	113
II.B.3.2	Le greffage	113
II.B.4	Méthode de calcul des constantes de dissociation par ACE	115
II.C	La spectrométrie de masse.....	117
II.C.1	L'ionisation par électronébulisation (électrospray ESI).....	117
II.C.2	Piège à ions quadripolaire (trappe à ions).....	119
II.D	Couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse	121
II.E	Optimisation des méthodes CE et MS	123
II.E.1	Préparation d'un nouveau capillaire d'électrophorèse.....	123
II.E.2	Tapissage par le PEO.....	124
II.E.2.1	Solutions utilisées.....	124
II.E.2.2	Protocole de tapissage	125
II.E.2.3	Paramètres de la méthode d'activation/tapissage.....	125
II.E.2.4	Etapes de conditionnement	126
II.E.2.5	Insertion et ajustement du capillaire d'électrophorèse dans l'interface	126
II.E.2.6	Paramètres de la méthode d'injection.....	127
II.E.2.7	Etapes d'injection en CE et CE-MS.....	127
II.E.2.8	Conditionnement pour la nuit	127
II.E.3	Greffage par l'hydroxypropylcellulose	129
II.E.3.1	Préparation de la solution de HPC et remplissage du capillaire	129

II.E.3.2	Cuisson du capillaire.....	129
II.E.3.3	Conditionnement avant utilisation	129
CHAPITRE 3 : INTERACTION SDF-1 α / OLIGOSACCHARIDES D'HEPARINE DE SYNTHÈSE.....		131
III.1	Introduction.....	133
III.2	Etude de l'interaction SDF-1 α /tetrasaccharides de synthèse par ACE.....	137
III.2.1	Analyse de SDF-1 α par CE.....	137
III.2.2	Rôle de la distribution des groupements sulfate dans l'interaction.....	139
III.2.3	Conclusion	149
III.3	Etude de l'oligomérisation de SDF-1 α en présence d'oligosaccharides de synthèse par ACE-MS	153
III.3.1	Détection de SDF-1 α par CE-MS.....	153
III.3.2	Stœchiométrie des complexes mesurée par ACE-MS.....	155
III.3.3	Discussion générale.....	161
III.4	Conclusion et perspectives	163
CHAPITRE 4 : INTERACTION MCP-1 / OLIGOSACCHARIDES D'HEPARINE DE SYNTHÈSE.....		165
IV.1	Introduction.....	167
IV.2	Etude de l'interaction MCP-1/tetrasaccharides de synthèse par ACE	169
IV.2.1	Analyse de MCP-1 par CE.....	169
IV.2.2	Rôle de la distribution des groupements sulfate dans l'interaction	169
IV.2.3	Conclusion.....	177
IV.3	Etude de l'oligomérisation de MCP-1 en présence d'oligosaccharides de synthèse par ACE-MS	179
IV.3.1	Détection de MCP-1 par CE-MS.....	179
IV.3.2	Stœchiométrie des complexes mesurée par ACE-MS	181
IV.3.3	Discussion générale	187
IV.4	Conclusion et perspectives	189
CHAPITRE 5 : OLIGOMERISATION DE L'INTERFERON GAMMA HUMAIN		191
V.1	Introduction.....	193

V.2	Détection de l'IFN γ par CE-MS	195
V.3	Complexes IFN γ / Oligosaccharides de synthèse par CE-MS.....	197
V.4	Complexes IFN γ / Oligosaccharides de synthèse par ACE-MS	201
V.5	Application à des échantillons biologiques	203
V.6	Conclusion et perspectives	204
	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	207
	MATERIEL	213
VI.1	Appareillage.....	215
VI.2	Produits	216
VI.2.1	La chimiokine SDF1 α	216
VI.2.2	La chimiokine MCP-1	216
VI.2.3	L'interféron gamma humain	217
VI.2.4	Oligosaccharides de synthèse sulfatés de type HP.....	217
	ANNEXES	219
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	251
	COMMUNICATIONS	275
	RESUME	277
	ABSTRACT	278

LISTE DES ABREVIATIONS

A		ELR	Acide Glutamique-Leucine-Arginine
Ac	Acétyle	ENA	Epithelial-derived neutrophil-activating peptide
Ala	Alanine A	ESI	Electrospray ionization
AOP	Aminooxypentane	F	
Arg	Arginine R	FACE	Frontal Analysis Capillary Electrophoresis
Asn	Asparagine N	FGF	Fibroblast growth factor
Asp	Acide aspartique D	FTICR	Fourier transform ion cyclotron resonance
AT	Antithrombine	G	
B		GAF	Gamma Activator Factor
BCA	B-lymphocyte Chemoattractant	GAG	Glycosaminoglycane
C		Gal	Galactose
C	Carbone	GalN	Galactosamine
Ca	Calcium	GalNAc	Galactosamine N-acétylée
CPN	N-Carboxypeptidase	GDP	Guanosine diphosphate
CS	Chondroïtine sulfate	GF	Growth Factor
CSF	Colony Stimulating Factor	Glc	Glucose
CTACK	Cutaneous T-cell-attracting chemokine	GlcA	Acide Glucuronique
Cys	Cystéine	GlcN	Glucosamine
CZE	Capillary Zone Electrophoresis	GlcNAc	Glucosamine N-acétylée
D		GlcNS	Glucosamine N-sulfatée
Da	Dalton	Gln	Glutamine Q
DC	Dendritic cell	Glu	Acide glutamique E
DS	Dermatane sulfate	Gly	Glycine G
DTT	Dithiothréitol	Gp	Glycoprotéine
E		GRO	Growth regulated oncogene
ECL	Extracellular loop	GTP	Guanosine triphosphate
ECM	Extracellular Matrix		

H		Lys	Lysine K
H	Atome d'hydrogène	M	
H11	Hexasaccharide synthétique	m/v	Rapport masse sur volume
HA	Acide hyaluronique	m/z	Rapport masse sur charge
His	Histidine H	Man	Manose
HPC	Hydroxypropylcellulose	MCP	Monocyte Chemoattractant protein
HPRG	Histidine-proline-rich glycoprotein	MCSF	Macrophage colony stimulating factor
HS	Héparane sulfate	Met	Méthionine M
HSPG	Protéoglycane d'héparane sulfate	MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
I		MS	Mass Spectrometry
ICC	Integrated ion-current	MW	Molecular weight
IdoA	Acide α -L-iduronique	N	
IdoA(2S)	Acide 2-O-sulfo- α -L-iduronique	NH ₄ OAc	Acétate d'ammonium
IFN	Interféron	NS	Domaines sulfatés de HS
IFN γ R	Récepteur de l'interféron gamma	NK	Natural Killer
IGIF	Interferon-gamma inducing factor	O	
IL	Interleukines	O11	Octasaccharide synthétique
Ile	Isoleucine I	P	
IMS	Ion mobility spectrometry	P8A	Proline-8-Alanine
IP	Interferon-inducible protein	PBEF	Pre-B cell colony enhancing factor
J		PBSF	Pre-B cell growth stimulating factor
Jak	Janus kinase	PDB	Protein Data Bank
K		PF	Platelet factor
Kd	Constante de dissociation	PG	Protéoglycane
kDa	Kilo Dalton	pH	Potentiel hydrogène
KS	Kératane sulfate	Phe	Phénylalanine F
L		pl	Point isoélectrique
Leu	Leucine L	ppm	Partie par million

Pro	Proline P	Trp	Tryptophane W
R		Tyr	Tyrosine Y
RANTES	Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted	V	
		v/v	Rapport volume sur volume
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire	Val	Valine V
S		VDW	Van der Waals
SDF	Stromal cell-derived factor	VGEF	Pre-B cell colony enhancing factor
Ser	Sérine S	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
SO ₃	Trioxyde de soufre	vMIP	Viral macrophage inflammatory protein
SPR	Résonance plasmonique de surface	W	
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription	WT	Wild Type
T		X	
T11	Tetrasaccharide synthétique	Xyl	Xylose
Thr	Thréonine T	Z	
TM	Transmembrane	z/m	Rapport charge sur masse
TNF	Tumor Necrosis Factor	Zn	Zinc

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Structure des protéoglycanes.	30
Figure 2 : Unités disaccharidiques des GAGs.	32
Figure 3 : Les fonctions des GAGs (liste non exhaustive).....	36
Figure 4 : Changement de conformation de l'AT-III créé par un pentasaccharide synthétique issu de HP.....	38
Figure 5 : Structures du fondaparinux et de l'idraparinux.....	44
Figure 6 : Exemple d'une séquence consensus.....	52
Figure 7 : Structures des chimiokines.....	60
Figure 8 : Monomère de la chimiokine IL-8 avec ses différents éléments de structure secondaire.....	62
Figure 9 : Structures cristallographiques de chimiokines.	64
Figure 10 : Schéma illustrant les étapes dans la migration cellulaire où de nombreuses chimiokines et d'interactions peuvent entrer en jeu.	66
Figure 11 : Topologie typique d'un récepteur à chimiokine.	68
Figure 12 : Les récepteurs couplés aux protéines G et leur(s) chimiokine(s) associée(s).	70
Figure 13 : Différents mécanismes pour la présentation des chimiokines sur des GAGs aux récepteurs des leucocytes.....	74
Figure 14 : Perturbations électrostatiques et stabilisation du dimère SDF-1.	80
Figure 15 : Représentation des surfaces de liaison des GAGs (bleu) des isoformes α et γ de SDF-1.....	84
Figure 16 : Spectre de masse ESI-FTICR dans 100 mM NH_4OAc (pH 6,8).	88
Figure 17 : Modélisation de l'interaction MCP-1/HP.....	90
Figure 18 : Modélisation moléculaire de l'IFN γ avec les régions C-terminales étendues.	94
Figure 19 : Structure cristallographique du complexe entre l'IFN γ et la partie soluble de la chaîne α du récepteur (bleu/vert).....	94
Figure 20 : Modèle de l'interaction IFN γ /HS.	96
Figure 21 : Schéma de principe de l'électrophorèse capillaire.	106
Figure 22 : Migration des espèces en solution sous l'effet d'un champ électrique positif dans un capillaire rempli d'électrolyte.....	106
Figure 23 : Schématisation de la double couche de Stern donnant lieu au flux électroosmotique.	110
Figure 24 : Déplacement des différentes espèces, cations, anions et neutres.....	110

Figure 25 : Poly(éthylène oxyde) (PEO)	114
Figure 26 : Liaisons hydrogène entre le PEO et la surface du capillaire de silice.....	114
Figure 27 : Hydroxypropylcellulose.....	114
Figure 28 : Représentation schématique d'une source par électronébulisation (en mode positif).	116
Figure 29 : Schéma d'un piège à ions quadripolaire à trois dimensions.....	118
Figure 30 : Schéma descriptif de l'interface de couplage coaxiale à 3 voies.....	122
Figure 31 : Structure des tetrasaccharides de synthèse de type héparine.....	132
Figure 32 : Structure de l'hexasaccharide de synthèse H11.....	134
Figure 33 : Electrophorégramme du marqueur neutre (MN) sur capillaire greffé HPC.....	136
Figure 34 : Electrophorégramme de SDF-1 α sur capillaire greffé HPC.....	136
Figure 35 : Electrophorégrammes de SDF-1 α en présence de T11 en concentration croissante obtenus par ACE.....	138
Figure 36 : Electrophorégrammes de SDF-1 α en présence de T12 en concentration croissante obtenus par ACE.....	142
Figure 37 : Electrophorégrammes de SDF-1 α en présence de T13 en concentration croissante obtenus par ACE.....	144
Figure 38 : Electrophorégrammes de SDF-1 α en présence de T21 en concentration croissante obtenus par ACE.....	146
Figure 39 : Electrophorégrammes de SDF-1 α en présence de T22 en concentration croissante obtenus par ACE.....	148
Figure 40 : Spectres de masse de SDF-1 α obtenus par CE-MS.....	152
Figure 41 : Spectre de masse de SDF-1 α obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces.	152
Figure 42 : Spectres de masse de SDF-1 α en présence de T11 obtenus par ACE-MS.	154
Figure 43 : Spectre de masse de SDF-1 α en présence de T11 obtenu par ACE-MS dans des conditions d'ionisation douces.....	154
Figure 44 : Spectres de masse de SDF-1 α en présence de T12 et T21 obtenus par ACE-MS.	156
Figure 45 : Spectres de masse de SDF-1 α en présence d'oligosaccharides obtenus par ACE-MS.....	158
Figure 46 : Spectre de masse de SDF-1 α en présence de H11 obtenu par ACE-MS.	160
Figure 47 : Electrophorégrammes de MCP-1 en présence de T11 en concentration croissante obtenus par ACE.....	168
Figure 48 : Electrophorégrammes de MCP-1 en présence de T12 en concentration croissante obtenus par ACE.....	170

Figure 49 : Electrophorégrammes de MCP-1 en présence de T13 en concentration croissante obtenus par ACE.....	172
Figure 50 : Electrophorégrammes de MCP-1 en présence de T21 en concentration croissante obtenus par ACE.....	174
Figure 51 : Spectre de masse de MCP-1 obtenus par CE-MS.....	178
Figure 52 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T11 obtenus par ACE-MS.....	180
Figure 53 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T12 obtenus par ACE-MS.....	182
Figure 54 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T21 obtenus par ACE-MS.....	182
Figure 55 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T13 obtenus par ACE-MS.....	184
Figure 56 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T22 obtenus par ACE-MS.....	184
Figure 57 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T23 obtenus par ACE-MS.....	186
Figure 58 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de H11 obtenus par ACE-MS.....	186
Figure 59 : Electrophorégramme de l'IFN γ sur capillaire greffé HPC.....	194
Figure 60 : Spectre de masse de l'IFN γ obtenu par CE-MS dans des conditions dénaturantes.....	194
Figure 61 : Spectre de masse de l'IFN γ obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces.....	194
Figure 62 : Spectre de masse de l'IFN γ en présence de T11 obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces après incubation de 1 h.....	196
Figure 63 : Spectre de masse de l'IFN γ en présence de H11 obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces après incubation de 1 h.....	198
Figure 64 : Structure de l'oligosaccharide de synthèse dodecasulfaté O11.....	198
Figure 65 : Spectre de masse de l'IFN γ en présence de O11 obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces après incubation de 1 h.....	198
Figure 66 : Spectre de masse de l'IFN γ en présence de H11 obtenu par ACE-MS.....	200
Figure 67 : Chromatogramme obtenu par HPLC.....	202
Figure 68 : Electrophorégramme de l'IFN γ en présence des fractions récoltées par HPLC.....	202
Figure 69 : Représentation schématique du spectromètre de masse Esquire 3000+ (Bruker Daltonics®).....	215
Figure 70 : Séquence de la protéine SDF-1 α humaine.....	216
Figure 71 : Séquence de la protéine MCP-1 humaine.....	216
Figure 72 : Séquence de l'interféron gamma humain (IFN γ).....	217

Tableaux

Tableau 1 : Classification des protéoglycanes humains (PGs) en fonction de leur localisation.	30
Tableau 2 : Les différences entre HP et HS.....	32
Tableau 3 : Caractéristiques de certains complexes protéine/HP connus.....	48
Tableau 4 : Les différentes familles de cytokines.....	56
Tableau 5 : Nomenclatures des chimiokines.	58
Tableau 6 : Liste des chimiokines avec leur structure tridimensionnelle connue.....	64
Tableau 7 : Constantes de dissociation (Kd) des isoformes α , β et γ de la chimiokine SDF-1.	84
Tableau 8 : Exemple de constantes de dissociation entre MCP-1 et des GAGs.	90
Tableau 9 : Caractéristiques techniques des méthodes d'analyse d'interactions protéines / ligands.....	102
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des paramètres pour une analyse CE ou CE-MS utilisant un capillaire greffé HPC.....	128
Tableau 11 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T11.....	140
Tableau 12 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T11 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	140
Tableau 13 : Mobilités électrophorétiques en présence de T12.	142
Tableau 14 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T12 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	142
Tableau 15 : Mobilités électrophorétiques en présence de T13.	144
Tableau 16 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T13 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	144
Tableau 17 : Mobilités électrophorétiques en présence de T21.....	146
Tableau 18 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T21 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	146
Tableau 19 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T22.....	148
Tableau 20 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T23.....	148
Tableau 21 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de H11.	150
Tableau 22 : Détermination de la constante de dissociation en présence de H11 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	150
Tableau 23 : Tableau récapitulatif des constantes de dissociation déterminées pour chaque oligosaccharide.	150
Tableau 24 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T11.....	168

Tableau 25 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T11 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	168
Tableau 26 : Mobilités électrophorétiques en présence de T12.....	170
Tableau 27 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T12 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	170
Tableau 28 : Mobilités électrophorétiques en présence de T13.....	172
Tableau 29 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T13 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	172
Tableau 30 : Mobilités électrophorétiques en présence de T21.....	174
Tableau 31 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T21 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	174
Tableau 32 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T22.....	176
Tableau 33 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de H11.....	176
Tableau 34 : Détermination de la constante de dissociation en présence de H11 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.....	176
Tableau 35 : Tableau récapitulatif des constantes de dissociation déterminées pour chaque oligosaccharide.....	178
Tableau 36 : Mobilités électrophorétiques obtenues pour les trois fractions d'oligosaccharides récoltées en HPLC.....	202

Annexes

Annexe 1 : Electrophorégrammes en présence de T11.....	221
Annexe 2 : Linéarisation.....	222
Annexe 3 : Electrophorégrammes en présence de T12.....	223
Annexe 4 : Linéarisation.....	224
Annexe 5 : Electrophorégrammes en présence de T13.....	226
Annexe 6 : Linéarisation.....	227
Annexe 7 : Electrophorégrammes en présence de T21.....	228
Annexe 8 : Linéarisation.....	230
Annexe 9 : Electrophorégrammes en présence de T22.....	231
Annexe 10 : Electrophorégrammes en présence de T23.....	232
Annexe 11 : Electrophorégrammes en présence de H11.....	233
Annexe 12 : Linéarisation.....	235
Annexe 13 : Electrophorégrammes en présence de T11.....	237
Annexe 14 : Linéarisation.....	238
Annexe 15 : Electrophorégrammes en présence de T12.....	239

Annexe 16 : Linéarisation	240
Annexe 17 : Electrophorégrammes en présence de T13	242
Annexe 18 : Linéarisation	243
Annexe 19 : Electrophorégrammes en présence de T21	244
Annexe 20 : Linéarisation	245
Annexe 21 : Electrophorégrammes en présence de T22	247
Annexe 22 : Electrophorégrammes en présence de H11	248
Annexe 23 : Linéarisation	249

INTRODUCTION GENERALE

Les interactions entre protéines et glycosaminoglycanes (GAGs) interviennent dans de nombreux processus physiologiques, tels que la signalisation et la reconnaissance cellulaire, mais également dans des processus pathologiques tels que les infections virales ou bactériennes ainsi que dans certains processus cancéreux. Dans l'optique d'enrichir les connaissances fondamentales sur les rôles biologiques des GAGs, il reste primordial de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ces interactions. Cette compréhension permettra sans doute de déboucher sur des applications thérapeutiques ou sur l'élaboration de biomatériaux.

Dans de très nombreux cas, les GAGs ont la capacité de promouvoir ou de renforcer l'oligomérisation de protéines présentées à leurs récepteurs, mais des interrogations subsistent quant aux stœchiométries « bioactives » des oligomères formés et aux séquences des GAGs impliqués. C'est pourquoi, de nombreuses recherches sont menées afin d'identifier ces séquences liant les protéines, mais également celles des oligosaccharides impliquées dans ces interactions. En ce qui concerne la séquence des oligosaccharides, leur détermination reste complexe. En effet, les GAGs sont par nature très hétérogènes, ce qui implique une multitude de séquences et donc de sites potentiels d'interaction. Ils présentent également une polydispersité plus ou moins importante, rendant les analyses plus complexes. Récemment, de nouveaux procédés ont été mis au point pour la synthèse de GAGs de type héparine avec une maîtrise parfaite de la structure permettant d'envisager des études plus informatives, cependant avec des limitations de taille.

Notre objectif est donc de trouver et d'exploiter des outils d'analyse dans le domaine de la glycobiologie afin de déterminer les séquences des GAGs impliquées et les structures quaternaires des complexes protéine/GAG formés. Contrairement aux anciens travaux menés au laboratoire en présence d'oligosaccharides issus de dépolymérisation enzymatique, nous avons eu recours à des oligosaccharides sulfatés de synthèse. Nous avons développé une méthode basée sur le couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse (CE-MS). L'électrophorèse capillaire est une méthode séparative rapide et résolutive permettant d'analyser des échantillons de pureté moyenne. L'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) permet également de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction, comme la constante de dissociation (K_d). La spectrométrie de masse est une puissante méthode d'analyse structurale permettant d'analyser par exemple les interactions non covalentes entre biomolécules et donc de déterminer la stœchiométrie de ces complexes formés ainsi que la séquence des GAGs. Le

développement de cette approche et son application aux oligosaccharides de synthèse nous ont permis d'établir une relation structure-activité de liaison pour deux protéines appartenant à la famille des cytokines. De même, nous avons développé une stratégie de « ligand fishing », à savoir identifier les ligands d'une protéine à partir d'un mélange hétérogène d'oligosaccharides.

Ce manuscrit se compose d'un premier chapitre de synthèse bibliographique, suivi d'un chapitre sur l'optimisation de la technique utilisée et de trois chapitres détaillant les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse.

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique décrivant les interactions entre les protéines et les glycosaminoglycanes. Ce chapitre est divisé en deux parties. La première est dédiée aux rôles physiologiques et pathologiques des GAGs. La seconde décrit les effets des GAGs sur la fonctionnalité des protéines, avec un regard particulier sur la famille des chimiokines appartenant aux cytokines.

Le deuxième chapitre regroupe les différentes méthodes expérimentales utilisées pour étudier les interactions protéines/oligosaccharides. Il détaille plus particulièrement l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse, ainsi que l'optimisation du couplage de ces deux techniques réalisée au cours de cette thèse pour étudier les interactions cytokines/GAGs.

Le troisième chapitre concerne l'étude de l'interaction de la chimiokine SDF-1 α avec des oligosaccharides sulfatés de synthèse de type héparine. L'ACE nous a permis d'apporter des données thermodynamiques (Kd) sur l'interaction SDF-1 α /GAGs de synthèse et l'ACE-MS nous a renseigné sur la stœchiométrie des complexes formés. Tous ces résultats nous ont permis de proposer une relation structure-activité de liaison.

Le quatrième chapitre concerne l'interaction de la chimiokine MCP-1 avec des oligosaccharides sulfatés de synthèse de type héparine. Construits sur le modèle du troisième chapitre, les résultats ont également permis d'apporter une relation structure-activité de liaison pour l'interaction MCP-1/GAGs de synthèse. Une comparaison avec SDF-1 α a également été faite.

Le cinquième chapitre concerne l'étude de l'homodimère de l'interféron gamma (IFN γ) par CE-MS et ACE-MS. Cette partie apporte pour la première fois des données en spectrométrie de masse sur la détection de l'homodimère naturel de l'IFN γ .

CHAPITRE 1 : INTERACTION PROTEINES / POLYSACCHARIDES

I.A Rôles physiologiques et pathologiques des GAGs

I.A.1 Définition et structure des GAGs

Les glucides peuvent exister en tant que sucres simples ou complexes connus sous le nom de glycanes. Les glucides sont des constituants essentiels des êtres vivants. Ils sont principalement connus pour leur rôle de stockage (ex : glycogène et amidon) et la production d'énergie cellulaire (ex : glycolyse et cycle de Krebs). Or, les glycanes servent aussi de médiateurs à une grande variété d'événements dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, qui sont cruciaux pour le développement des organismes multicellulaires complexes.

Notre étude bibliographique se focalise plus particulièrement sur les propriétés structurales de certains glycanes linéaires appelés glycosaminoglycanes (GAGs).

I.A.1.1 Localisation des glycosaminoglycanes

Dans la nature, toutes les chaînes de GAG à l'exception de l'acide hyaluronique (HA) sont liées de façon covalente à une protéine (core protéique) pour donner un protéoglycane (PG) (Figure 1). A la surface des cellules, l'enveloppe créée par les protéoglycanes porteurs de différents GAGs est appelée le glycocalyx. La liaison du GAG au core protéique se fait par l'intermédiaire de deux résidus galactoses (Gal) et d'un résidu xylose (Xyl) liés à un résidu sérine. Ces résidus saccharidiques sont liés à la protéine par une liaison O-glycosidique sur la fonction hydroxyle d'une sérine (GAG-Gal-Gal-Xyl-O-CH₂O-CH_α-protéine). Des séquences saccharidiques différentes peuvent être attachées à plusieurs résidus sérine de la partie protéique. Pratiquement toutes les cellules de mammifères produisent des PGs et peuvent les sécréter dans la matrice extracellulaire, les insérer dans la membrane plasmique, ou les stocker dans des granules de sécrétion. Les PGs sont généralement classés en quatre grandes familles : les PGs intracellulaires, membranaires, extracellulaires et circulants. Le Tableau 1 classifie de manière non exhaustive les PGs humains.

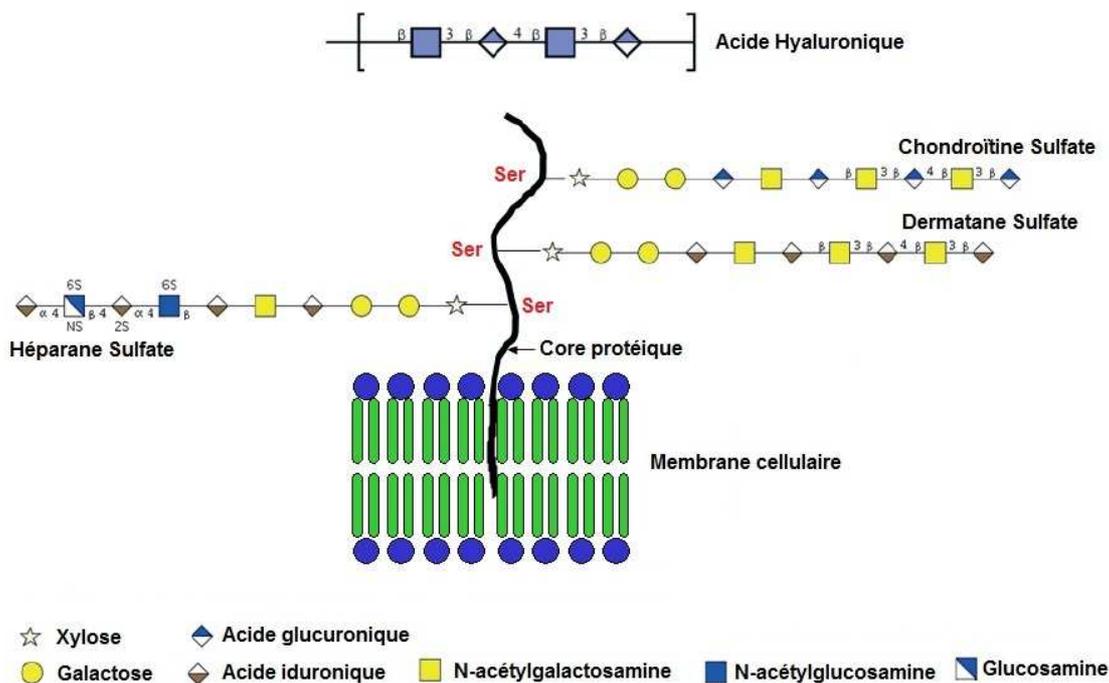


Figure 1 : Structure des protéoglycanes.

HS, le dermatane sulfate et la chondroïtine sulfate sont liés à une protéine via un résidu sérine. On peut noter que l'acide hyaluronique n'est associé à aucun core protéique. La schématisation des saccharides est celle définie par Ceroni *et al.* [1].

	PG	Type de GAG
PGs membranaires	Syndécannes Glypicannes Bétaglycanes Isoformes de CD44	Principalement HS et CS Principalement HS Principalement HS HS ou CS
PGs de la matrice extracellulaire	Collagènes XVIII et XV Agrine Bamacane Versicane Aggrécane Neurocane Brévicanne Perlécane Decorine Biglycane Lumicane Fibromoduline	Principalement CS CS et KS CS CS Principalement HS DS DS ou CS KS KS
PGs intracellulaires	Serglycine	HS ou CS
PGs circulants	Bikunine PG100 ou MCSF1 ApoO Endocane	CS Unique chaîne de CS CS Unique chaîne de DS

Tableau 1 : Classification des protéoglycanes humains (PGs) en fonction de leur localisation.

Il existe deux principaux types de PGs portant des GAGs [2] : les syndécannes et les glypicannes. La partie protéique de chaque famille est différente : les syndécannes sont composés d'une protéine membranaire intégrale alors que les glypicannes ont une partie protéique avec un groupement glycosylphosphatidylinositol permettant l'ancrage à la membrane. Les protéoglycanes sont connus pour avoir une affinité avec une variété de ligands, y compris les facteurs de croissance, des molécules d'adhésion cellulaire, des composants de la matrice, des enzymes et des inhibiteurs d'enzyme [3].

I.A.1.2 Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes sont des hydrates de carbone modifiés qui interagissent avec un large éventail de protéines impliquées dans les processus physiologiques et pathologiques [4, 5]. Les glycosaminoglycanes sont parfois appelés mucopolysaccharides en raison de leur viscosité (propriétés lubrifiantes), que l'on trouve dans les sécrétions des muqueuses. Ces molécules sont présentes sur toutes les surfaces de cellules animales dans la matrice extracellulaire (ECM), et certaines sont connues pour lier et réguler un certain nombre de protéines, y compris les cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, morphogènes, enzymes et molécules d'adhérence [4].

I.A.1.2.1 *Classification*

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polysaccharides linéaires chargés négativement, le plus souvent sulfatés et qui ont une masse moléculaire d'environ 10-100 kDa. Il existe deux principaux types de GAGs : les GAGs non sulfatés incluant uniquement l'acide hyaluronique (HA), et les GAGs sulfatés comprenant la chondroïtine sulfate (CS), le dermatane sulfate (DS), le kératane sulfate (KS), l'héparine (HP) et l'héparane sulfate (HS). Les chaînes des glycosaminoglycanes sont composées d'unités disaccharidiques répétitives (Figure 2). Les unités de répétition sont composées d'acide uronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) et de sucres aminés (D-galactosamine ou D-glucosamine). La structure des GAGs diffère selon le type d'unités qu'ils contiennent, ainsi que par la géométrie de la liaison glycosidique α ou β entre ces unités. Les CS et DS, qui contiennent une unité galactosamine, sont appelés galactosaminoglycanes, alors que HP et HS, qui contiennent une unité glucosamine, sont appelés glucosaminoglycanes.

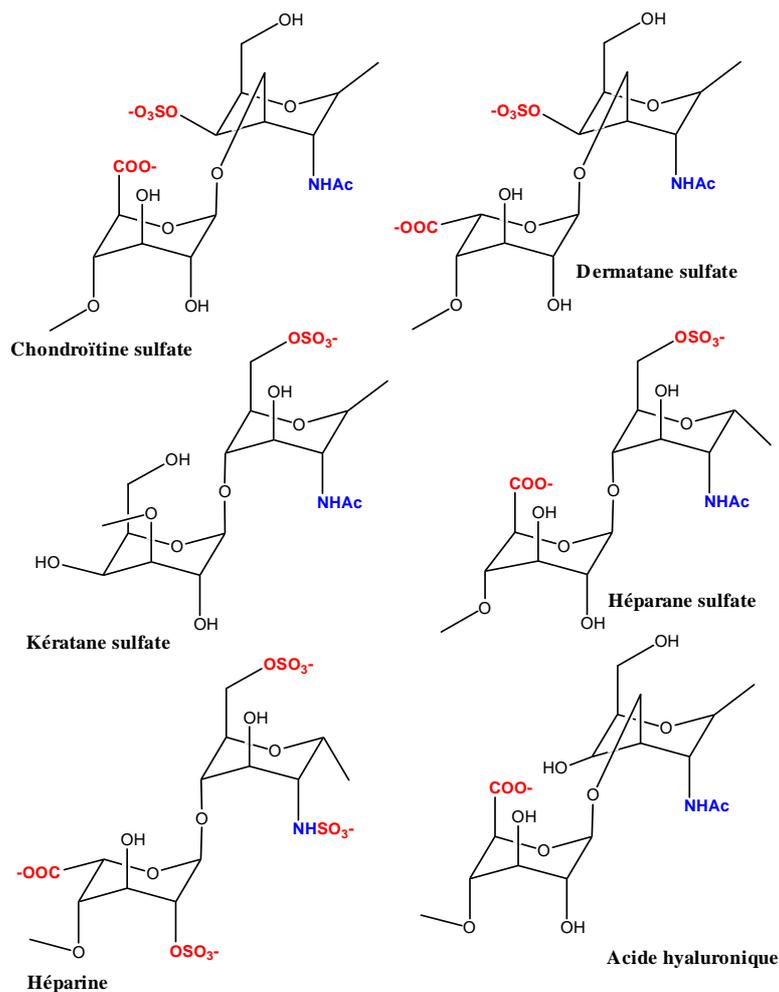


Figure 2 : Unités disaccharidiques des GAGs.

Propriétés	HS	HP
2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl (GlcNS)	40 – 60 %	> 85 %
Acide α -L-iduronique (idoA)	30 – 50 %	> 70 %
Masse moléculaire	10 – 70 kDa	10 – 12 kDa
Disaccharide majoritaire	 D-GlcA- β (1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc- α (1 \rightarrow 4)	 L-idoA2S- α (1 \rightarrow 4)-D-GlcNS6S- α (1 \rightarrow 4)
Disaccharide minoritaire variable (X = H ou SO ₃ ⁻ , Y = Ac, SO ₃ ⁻ ou H)	 	

Tableau 2 : Les différences entre HP et HS.

Le sucre aminé peut être sulfaté sur les carbones 3, 6 et/ou sur l'azote (non-acétylé), cependant la sulfatation du squelette des GAGs peut l'être en différentes positions. A pH physiologique, les acides carboxyliques et les groupements sulfate sont déprotonés, donnant aux GAGs de très fortes densités de charges négatives (HP ayant la plus haute) [6].

I.A.1.2.2 Nomenclature et structure de HP et HS

Le nom des monosaccharides présents dans les GAGs est souvent abrégé. Les plus courantes sont les abréviations de trois lettres pour les monosaccharides simples (e.g. Gal pour le galactose, Glc pour le glucose, Xyl pour le xylose, et Man pour le mannose). La plupart des monosaccharides sont dans une configuration D, à l'exception de l'acide iduronique (IdoA). Tous les monosaccharides sont supposés être sous la forme pyranose (cycle à six carbones). Ces monosaccharides sont en outre classés en fonction de la position et de la nature des substituants. Pour le groupement sulfate, si celui-ci est lié au carbone C2 de l'acide iduronique, il est dénommé IdoA2S. De même, la sulfatation des positions 2 et 6 de la N-acétylglucosamine peut être écrite comme GlcNS6S. La liaison glycosidique entre les monosaccharides est de configuration α ou β , impliquant l'hydroxyle anomérique d'un monosaccharide et un groupement hydroxyle disponible dans un second monosaccharide. Par exemple, α (1 \rightarrow 4) se réfère à la liaison α dans un disaccharide entre le carbone anomérique du premier monosaccharide et l'hydroxyle en position 4 de l'autre monosaccharide.

Actuellement, les GAGs qui possèdent le plus grand intérêt thérapeutique sont HP et HS, c'est pourquoi seules leurs nomenclature et structures seront présentées dans ce manuscrit. HP est connue pour être très conservée avec des structures similaires dans un large éventail d'organismes vertébrés et invertébrés [7], comme la dinde [8], la baleine [9], le chameau [10], la souris [11], l'homme [12], le homard [13], la crevette [14], la moule [15], les espèces marines de palourdes [16] et le crabe [17]. La différence entre l'HS et l'HP est quantitative et non qualitative [18]. HS contient un niveau plus élevé de glucosamine acétylé et est moins sulfaté que HP [18]. HP est synthétisée et stockée exclusivement dans les mastocytes, tandis que HS est exprimé à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire dans le cadre d'un PG [19]. Le Tableau 2 regroupe les différences entre HP et HS. Au vu de ces ressemblances, HP constitue un bon modèle pour les études *in vitro*, notamment sur les interactions entre protéines et HP/HS. HP est plus disponible que HS, *via* son extraction de chez l'animal (porc).

HP se compose d'unités disaccharidiques répétitives liées 1 → 4 de l'acide pyranosyluronique et du 2-amino-2-deoxyglucopyranose (glucosamine). Les résidus d'acides uroniques sont généralement constitués de 90% d'acide L-idopyranosyluronique (acide L-iduronique) et de 10% d'acide glucopyranosyluronique (acide D-glucuronique). Le groupement amino du résidu glucosamine peut être substitué par un groupement acétyle ou sulfate, ou rester non substitué. Les positions 3 et 6 des résidus glucosamine peuvent être substituées à un groupement O-sulfate ou rester non substituées. L'acide uronique peut être soit un acide L-iduronique ou un acide D-glucuronique, et peut également contenir un groupement 2-O-sulfate. HS est structuralement lié à HP, mais est beaucoup moins substitué par des groupements sulfate que HP. Comme HP, l'HS est un copolymère linéaire constitué d'unités répétitives acide uronique-(1 → 4)-glucosamine. L'acide D-glucuronique prédomine dans l'HS, mais il peut également contenir des quantités importantes d'acide L-iduronique. HS contient en général un groupement sulfate par disaccharide, mais la sulfatation a tendance à varier [19]. A la surface de la cellule, les groupements O-sulfate et N-sulfate sont déprotonés dans l'HS et attirent les espèces chargées positivement.

Les chaînes HS contiennent souvent des domaines ayant une faible sulfatation par rapport à HP. Les régions non-sulfatées qui ont une séquence GlcA-GlcNAc (glucosamine acétylé) sont les plus communes dans la chaîne HS. Les régions sulfatées (appelés domaines S) sont généralement composées de 5 à 10 disaccharides [20]. Il existe aussi des proportions relativement mineures de séquences mixtes, qui contiennent à la fois GlcNSO₃ et GlcNAc (appelé domaine NA). Une proportion importante de la chaîne HS peut consister en une alternance de résidus GlcA-GlcNAc sans sulfatation.

HP et HS peuvent être distingués par leur sensibilité à l'égard des enzymes microbiennes dégradant les GAGs. Trois lyases recombinantes, les héparines lyases I, II et III, isolées de *Flavobacterium heparinum*, sont capables de cliver les chaînes HP et HS [21-23]. Ces trois enzymes partagent très peu d'homologie au niveau ADN, protéique ou structural, ce qui leur confère une spécificité remarquable envers leurs substrats. HP lyase I est impliquée dans la dégradation de HP en coupant les liaisons 1 → 4 entre les hexosamines et l'acide iduronique O-sulfatés. HP lyase III manifeste une forte spécificité pour HS en coupant les liaisons 1 → 4 entre les hexosamines et les résidus d'acide glucuronique. HP lyase II agit sur HP ainsi que sur HS à travers deux sites actifs, à savoir les liaisons 1 → 4 entre les hexosamines et les résidus d'acide uronique (résidus d'acide iduronique et d'acide glucuronique).

Les protéoglycanes HS (HSPGs) sont la principale composante de la matrice extracellulaire chez les mammifères [24]. L'hétérogénéité structurale de HS par rapport à la

taille de la chaîne polysaccharidique, le rapport IdoA/GlcA, et le nombre et la répartition des groupements sulfate le long du squelette carboné, sont le résultat de variations dans la biosynthèse des HSPGs. La structure fine des chaînes dépend de l'expression et de l'action de plusieurs enzymes de biosynthèse, comme les glycosyltransférases, les sulfotransférases et une épimérase, alignées dans la lumière de l'appareil de Golgi. Les réactions catalysées par ces enzymes donnent des chaînes individuelles dont les séquences sont souvent différentes [25].

I.A.2 Fonctions biologiques des GAGs

I.A.2.1 Fonctions physiologiques

L'héparine est un GAG de sécrétion ayant une action d'inhibition de la coagulation. Elle est sécrétée par les mastocytes dans lesquels elle est stockée sous forme de granules [12]. L'héparine se retrouve à peu près dans tous les tissus mais elle est surtout abondante dans le foie, les poumons et les muscles.

HS intervient dans de nombreux processus tels que l'adhésion cellulaire, la régulation et la croissance cellulaire [26, 27].

Les autres GAGs présentent également d'importantes fonctions biologiques. Le plus simple des glycosaminoglycanes non sulfaté, l'acide hyaluronique, a d'importants rôles fonctionnels [6], dans la signalisation au cours de la morphogenèse embryonnaire [28], dans les maladies pulmonaires et vasculaires [29] et dans la cicatrisation des plaies [30]. L'acide hyaluronique intervient aussi dans la lubrification des articulations synoviales et dans le mouvement des articulations [31].

La fonction principale des chondroïtines sulfates est de protéger le cartilage des articulations contre les réactions enzymatiques et contre les dommages dus aux radicaux libres. De part leur hydrophilie, ils maintiennent la pression osmotique au niveau des articulations et hydratent le cartilage. Ils sont également connus pour jouer un rôle important dans la division cellulaire et le développement des neurones [32].

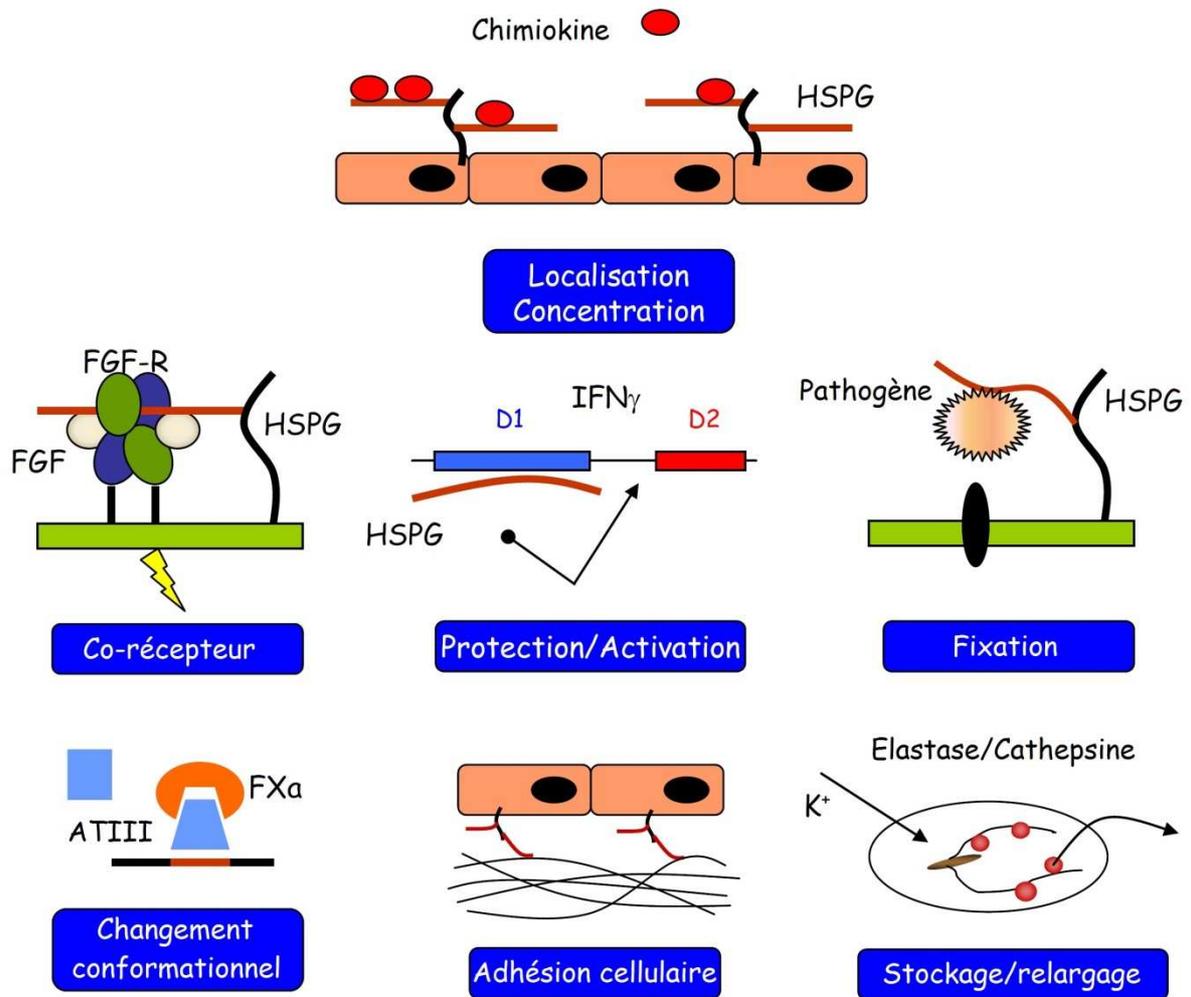


Figure 3 : Les fonctions des GAGs (liste non exhaustive).

Ils permettent en particulier la création de gradient de chimiokines en localisant et concentrant celles-ci, ils jouent un rôle dans la protection des protéines contre la protéolyse. Leur biodisponibilité permet également de stocker et relarguer certains facteurs. Les GAGs sont également connus comme étant des récepteurs d'attachement, notamment pour les pathogènes, et même des co-récepteurs sans lesquels certains signaux ne pourraient pas être transmis. Ils permettent l'adhésion cellulaire et l'assemblage de la matrice en interagissant avec des molécules clés telles que les intégrines. Ils sont en interaction avec les protéines, pouvant induire des changements de conformation comme cela est le cas avec l'AT-III.

Le dermatane sulfate joue un rôle dans la reconnaissance cellulaire, la cicatrisation (présent dans le derme, il active croissance cellulaire et réactions immunitaires), certaines infections parasitaires (les protéoglycanes sont les cibles du virus de la Dengue, de l'Herpès, des sporocystes de la Malaria...) et présente également des activités anticoagulantes (il catalyse l'inhibition de la thrombine) [33].

Le kératane sulfate de type I assure la transparence de la cornée en maintenant un taux d'hydratation élevé [34].

Les glycosaminoglycanes jouent donc un rôle majeur dans la signalisation cellulaire et le développement, l'angiogenèse [35], la croissance axonale [36], la progression tumorale [37, 38], les métastases [37, 39] et la coagulation [40, 41].

I.A.2.2 Mécanismes d'action des GAGs

Les glycosaminoglycanes sont importants, en particulier dans les processus biologiques nécessitant une communication entre les cellules. Ces processus peuvent être la prolifération, la migration, la différenciation ainsi que les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire. Parmi les principaux mécanismes des GAGs, peuvent être citées : l'induction du changement conformationnel de certaines protéines (cas de l'antithrombine III), la participation dans les interactions protéine-protéine (cas de l'antithrombine III et de la thrombine), la fonction de co-récepteur (e.g. du FGF), ainsi que celle de récepteur ou plutôt de site d'ancrage pour divers pathogènes tels que le VIH. Les GAGs ont également une utilité dans le stockage et le relargage de protéines (e.g. élastase et cathepsine), ainsi que dans l'adhésion cellulaire et l'assemblage matriciel. Les fonctions des GAGs dans la localisation et la concentration des chimiokines (e.g. SDF-1 α), des cytokines (e.g. l'IFN γ), de facteurs de croissance ou autres médiateurs ainsi que dans la protection de protéines vis-à-vis d'agents de la protéolyse (e.g. IFN γ et SDF-1 α) peuvent être également citées (Figure 3).

- Les GAGs peuvent induire un changement conformationnel des protéines.

L'interaction la plus caractérisée est celle de HP et de l'inhibiteur de protéase à sérine, l'antithrombine III (AT-III) [42-44].

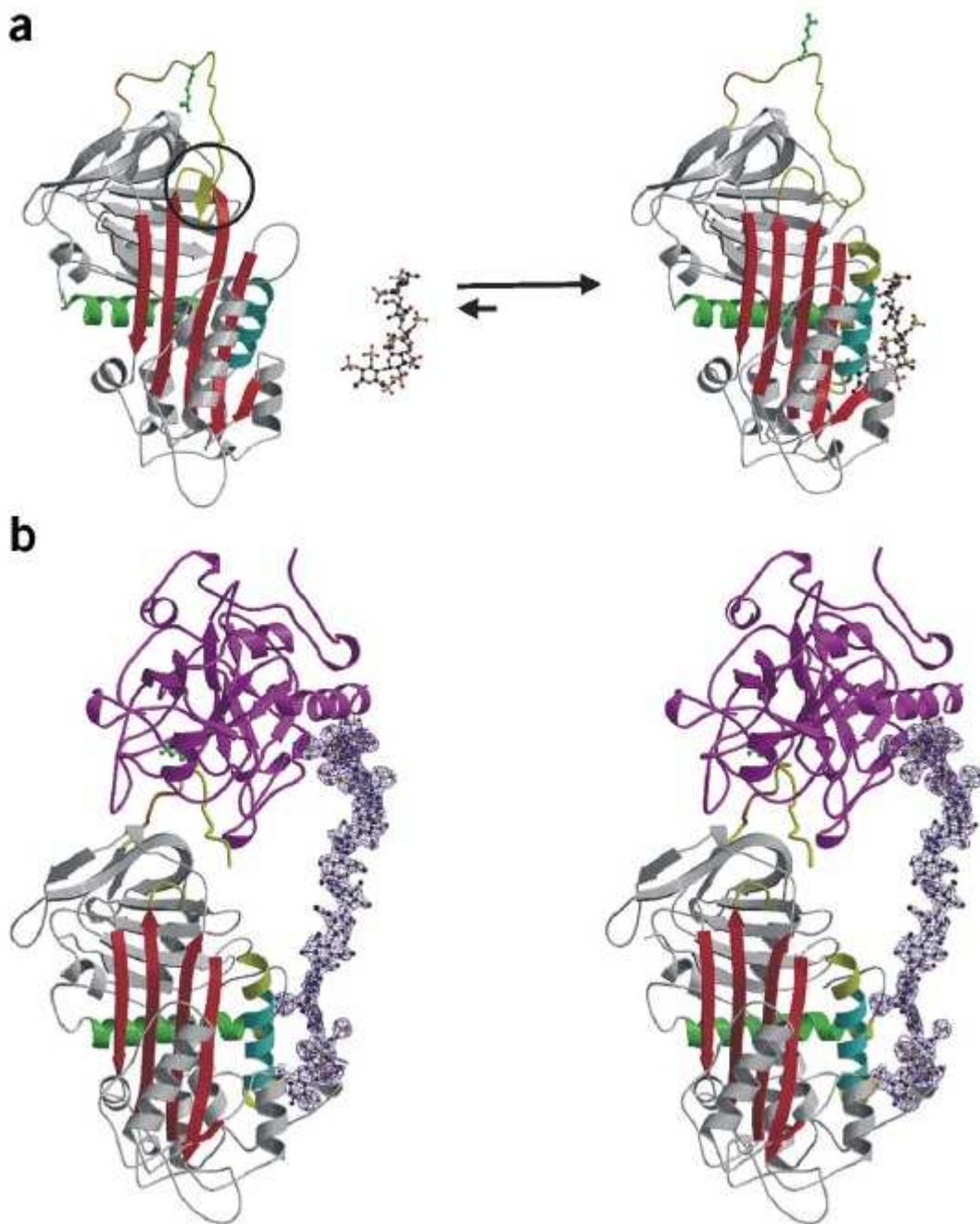


Figure 4 : Changement de conformation de l'AT-III créé par un pentasaccharide synthétique issu de HP.

(a) HP catalyse l'inhibition de la thrombine par l'antithrombine. La figure montre que la fixation d'un pentasaccharide synthétique spécifique de type HP induit un changement conformationnel de l'AT-III. Ce changement conformationnel se traduit par l'expulsion d'une région (entourée par un cercle noir sur la représentation de gauche) de la RCL (Reactive Center Loop représentée en jaune) en dehors de la partie globulaire de la protéine. L'expulsion de cette région augmente la flexibilité de la RCL (Jaune) et libère une arginine (représentée en vert dans la boucle). Cette arginine et la flexibilité de la boucle vont permettre d'engager l'interaction avec la thrombine et son inhibition. (b) Structure du complexe ternaire AT-III-thrombine-HP [45].

Cette interaction induit un changement de conformation de l'AT-III (Figure 4a) qui peut alors exercer son activité d'inhibiteur vis-à-vis de la thrombine et du Facteur Xa, les deux protéases à sérine impliquées dans la voie de coagulation [46]. Une inhibition de l'une ou de ces deux protéases ralentit ou annule le processus de coagulation.

- Les GAGs favorisent les interactions protéine-protéine.

L'exemple le plus connu est celui de la formation du complexe ternaire : AT-III-thrombine-HP. La fixation de HP à l'AT-III induit un changement conformationnel de cette protéine [46] : le centre réactif enfoui au cœur de la protéine est extériorisé. La fixation de HP est à l'origine de l'accroissement de son potentiel d'inhibition. En effet, cette modification va lui permettre alors d'interagir avec la thrombine dans la mesure où le fragment d'HP forme également un complexe avec cette dernière. Le modèle d'interaction entre les trois molécules est présenté dans la Figure 4b.

- Les GAGs peuvent servir de récepteur d'internalisation.

Le recyclage des PGs s'effectue par internalisation, transportant les PGs de la membrane jusqu'aux lysosomes situés dans le cytoplasme. Il n'est pas exclu que, lors de l'internalisation, des protéines liées aux GAGs des PGs soient également co-internalisées. Ceci est notamment le cas pour les protéines telles que le complexe follistatine/activine, la vitronectine, la thrombospondine, le FGF-2 ainsi que l'AT-III et la lipoprotéine lipase dont la clairance¹ plasmatique dépend en grande partie des PGs [2].

- Les GAGs participent à l'organisation de la matrice et à l'adhésion cellulaire.

La localisation des GAGs et leurs caractéristiques physico-chimiques leur permettent également d'exercer des fonctions dans l'organisation de la matrice et dans l'adhésion cellulaire. L'interaction entre les chaînes d'HS portées par des PGs de la surface cellulaire et la fibronectine est, par exemple, très importante dans les adhésions cellules-matrices [47]. Dans les interactions du même type, les GAGs peuvent interagir avec certains collagènes pour renforcer l'adhésion cellulaire. La laminine, une protéine de la matrice extracellulaire essentiellement présente dans les membranes basales, interagit également avec les GAGs de type HS ou CS [48].

¹ La clairance est la capacité d'un tissu, organe ou organisme à éliminer d'un fluide (le sang, la lymphe...) une substance donnée.

- Les GAGs permettent le stockage et le relargage de protéines.

Dans les mastocytes, lieu de production et de relargage de HP, il a été démontré que HP était essentielle pour le stockage de protéases telles que MCP-4 ou MCP-5 (Mast Cell Protease), ou la carboxypeptidase A (MC-CPA) [49, 50]. Dans le même registre, il a également été montré que les neutrophiles étaient capables d'agir face aux micro-organismes sous l'influx d'un signal potassique dépendant du pH, grâce à un relargage de protéases telles que l'élastase et la cathepsine G qui sont stockées, associées à des GAGs [51]. Par ailleurs, les facteurs de croissance tels que les FGFs et les VEGF sont stockés, stabilisés, et protégés grâce aux interactions avec des chaînes de GAGs dans les membranes basales.

- Les GAGs localisent, concentrent et permettent les gradients de médiateurs.

Les GAGs sont largement impliqués dans les processus de signalisation cellulaire en modulant la biodisponibilité de messagers tels que les facteurs de croissance, les cytokines ou les chimiokines. La plupart des messages transmis par ces protéines sont localisés et très souvent temporaires. Dès leur sécrétion, les chimiokines sont capturées par les GAGs ce qui évite leur diffusion et donc permet d'avoir une concentration maximale du médiateur à l'endroit de leur sécrétion. Grâce à ces interactions chimiokines/GAGs, les chimiokines constituent un gradient qui correspond au chimiotactisme. Les cellules circulantes peuvent alors, par exemple remonter jusqu'à un site d'inflammation en suivant le gradient chimioattractant ainsi formé sur l'endothélium et dans la matrice extracellulaire [2, 52, 53] (I.B.3.2).

- Les GAGs protègent certaines protéines vis-à-vis de la protéolyse.

Les médiateurs déjà cités tels que les chimiokines, cytokines et facteurs de croissance sont utilisés par l'organisme. Leur élimination se doit d'être très efficace lorsque les besoins n'existent plus. Ils sont, d'une manière générale, extrêmement sensibles à la protéolyse, et donc le temps de demi-vie de ces molécules est en général très court [54, 55]. Les HS permettent de protéger de la protéolyse des facteurs tels que FGF-2, qui est sensible à la plasmine [56] ou le TGF β (Transforming Growth Factor β) [57], l'IL-7 (interleukine-7) [58], et l'IFN γ (interféron gamma) [59, 60]. Dans un autre registre, les HS permettent de conserver l'intégrité de gp120, une glycoprotéine de l'enveloppe du VIH sensible à l'action de la PDI (Protein Disulfideisomerase). Cette PDI clive deux des neuf ponts disulfures de gp120 pour permettre la fusion du virus avec la cellule cible. Or, il a été montré que l'interaction de

gp120 avec les HS ne permettait plus à la PDI d'exercer son activité réductrice, exemple supplémentaire de la fonction protectrice des GAGs [61].

- Les GAGs jouent le rôle de récepteurs d'attachement pour les pathogènes.

Outre les fonctions des GAGs essentielles à l'organisme qui les produit, les caractéristiques des glycosaminoglycanes peuvent également être détournées par certains pathogènes, parasites, bactéries ou virus. Parmi les pathogènes se servant des GAGs comme récepteurs d'ancrage, les parasites tel que *Plasmodium falciparum* (responsable de la forme létale de la Malaria), se fixent en particulier sur les CS [62]. Les GAGs peuvent également servir de site d'attachement pour des bactéries telles que *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus*, *Helicobacter pylori* [2]. De nombreux virus présentent également une affinité pour les GAGs qu'ils utilisent pour s'adsorber à la surface des cellules avant de fusionner avec une cellule cible. Parmi les nombreux virus connus pour se fixer aux GAGs peuvent être cités : le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), le virus Herpès et aussi le virus de la Dengue. Dans le phénomène d'infection, la fixation des virus aux cellules est une étape critique. Une fois le point d'ancrage trouvé et donc l'interaction avec les GAGs ou autres molécules d'ancrage faite, l'infection des cellules cibles sera plus aisée. Par exemple, il a été montré que les syndécanes à la surface des macrophages étaient une classe abondante de « récepteurs » du VIH-1 [63]. D'autres travaux montrent que les syndécanes sont capables de capturer et de protéger le virus sur des cellules endothéliales. Le virus garde alors toutes ses propriétés infectieuses, dans l'attente d'être présenté aux lymphocytes T [64].

I.A.2.3 Pathologies associées

Les pathologies liées aux polysaccharides peuvent être dues à des dysfonctionnements de leur catabolisme² ou de leur anabolisme³. D'autres anomalies peuvent apparaître lors de l'interaction avec des protéines cibles.

Les pathologies résultant d'anomalies cataboliques des GAGs les plus connues sont les mucopolysaccharidoses. Ce sont des maladies génétiques dégénératives, à transmissions récessives, liées à des déficits enzymatiques. Ces enzymes n'assurent plus leur rôle qui est de dégrader les GAGs, elles sont donc responsables de leur accumulation

² Catabolisme = ensemble des réactions de dégradations moléculaires de l'organisme.

³ Anabolisme = ensemble des réactions de synthèses moléculaires de l'organisme.

dans certains tissus. Cette accumulation a pour conséquence l'altération de processus cellulaires physiologiques. Les symptômes nombreux et variés peuvent associer des troubles neurologiques à des dysmorphies physiques [65].

L'ostéoarthrite, ou arthrose, est une pathologie résultant d'un défaut de synthèse d'acide hyaluronique et de chondroïtine sulfate dans les articulations. C'est une maladie chronique dégénérative qui touche les articulations de plus de 900 000 personnes dans le monde chaque année. La surface du cartilage à l'extrémité des os se fissure et finit par disparaître du fait de l'altération des chondrocytes ; parallèlement la prolifération d'ostéophytes (excroissances osseuses) gêne les mouvements articulaires. L'altération du cartilage est la conséquence de la perte de viscosité et d'élasticité de la synovie, dont le composant principal est l'acide hyaluronique. La production locale de cytokines lors de la réaction inflammatoire détruit progressivement les composants de la synovie et inhibe leur biosynthèse. L'injection dans l'articulation touchée de polysaccharides (acide hyaluronique et chondroïtine sulfate) associée à des anti-inflammatoires est actuellement le traitement le plus utilisé. De nouvelles approches thérapeutiques, telle que la stimulation de la synthèse de ces polysaccharides, sont toujours à l'étude [66, 67].

Les pathologies les plus récemment décrites impliquent l'interaction de protéines avec des GAGs. La maladie d'Alzheimer représente actuellement plus de la moitié des cas de démences et son évolution est croissante. Les principaux symptômes de la maladie sont l'amnésie, la perte des repères spatio-temporels et des troubles du langage. La cause physiologique de ces troubles est liée à une détérioration progressive du tissu cérébral par trois types de lésions : la formation de plaques séniles (accumulation extracellulaire anormale de la protéine β -amyloïde), les dégénérescences neurofibrillaires (accumulation de la protéine Tau hyperphosphorylée) et la dégénérescence des neurones du cortex cérébral. En 1988, Snow *et al.* mettent en évidence la présence de protéoglycanes HS dans ces lésions [68]. Il faudra attendre une quinzaine d'années pour comprendre les rôles négatifs joués par ces HS : une protection de la protéine β -Amyloïde vis-à-vis sa protéolyse et l'activation de la phosphorylation de la protéine Tau [69, 70]. La présence de ces protéoglycanes favoriserait ainsi la formation de lésions.

Enfin, les glycosaminoglycanes sont également connus pour promouvoir la pathogénèse microbienne [71, 72] en interagissant avec plusieurs micro-organismes pathogènes sur les surfaces des cellules et la matrice extracellulaire. De nombreux micro-organismes pathogènes comme les bactéries (e.g. *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Chlamydia trachomatis*), des virus (e.g. herpès *simplex*) et les protozoaires (e.g. *Plasmodium* et *Leishmania*) expriment des protéines capables de se lier à

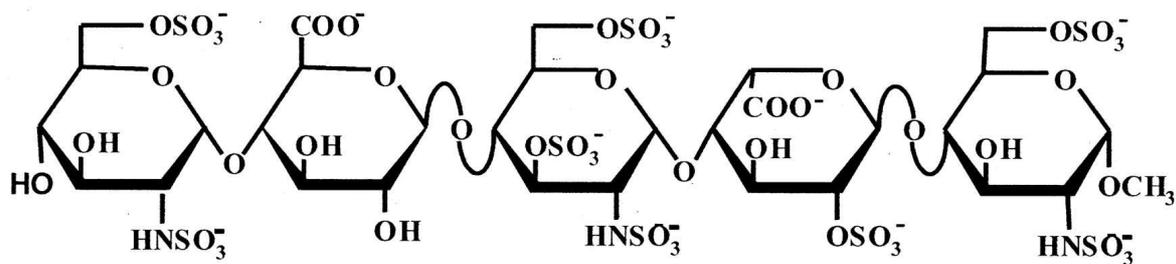
l'HS, DS et CS sur la cellule, et ces interactions semblent provoquer l'infection [72]. La dengue et les virus de la fièvre aphteuse interagissent avec les protéoglycanes d'HS de la surface cellulaire et favorisent ainsi la concentration de particules virales à la surface cellulaire après la liaison. HS présent à la surface des cellules interagit avec les glycoprotéines gB, gC et gD [73, 74], connues pour être présentes sur l'enveloppe virale et pour favoriser l'infection [75]. A l'inverse, HP est connue pour exercer son activité anti-VIH-1 en se liant à la glycoprotéine de surface virale, gp120 [76, 77], bloquant ainsi l'entrée du VIH-1 dans les cellules.

I.A.3 Potentiel thérapeutique et mimétique des GAGs

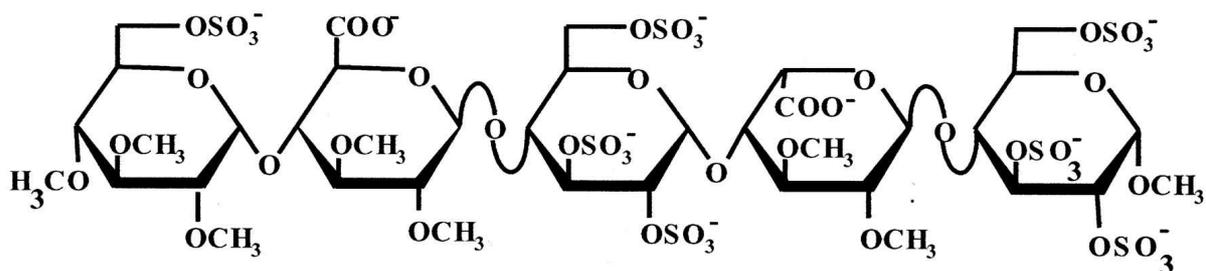
L'activité biologique des glucides, tels que les GAGs, est médiée par leur liaison à des protéines. Ces interactions protéine-glucide peuvent être imitées par la conception de molécules médicaments ayant une affinité de liaison appropriée et sélective. Toutefois, un problème important réside dans le fait que les affinités entre protéines et GAGs sont moyennes (constante de dissociation milli- à micromolaire), alors que les molécules médicaments ont tendance à exiger des constantes de dissociation de l'ordre du nanomolaire. Par conséquent, les composés synthétiques spécifiquement conçus pour imiter la structure et les interactions des hydrates de carbone ont besoin de se lier à leurs récepteurs avec une affinité plus élevée que l'affinité naturelle des oligosaccharides. Des stratégies basées sur les interactions HP/HS-protéine ont été récemment décrites et paraissent prometteuses pour la découverte de médicaments de type GAG [78]. Des médicaments à base de glycosaminoglycanes peuvent agir de plusieurs manières en activant (agonistes) ou inactivant (antagonistes) les récepteurs des protéines, en concurrence avec les GAGs endogènes.

La diversité moléculaire des interactions de HP/HS a été exploitée pour le développement du mimétisme⁴ des GAGs [79]. Des séquences de GAG peuvent se lier spécifiquement et rendre les interactions uniques avec un grand nombre de protéines, comme par exemple les chimiokines [80] et les facteurs de croissance [81]. Néanmoins, la conception de ces molécules mime, nécessite une compréhension du mécanisme et de la spécificité d'une interaction donnée entre un GAG et une protéine. Le premier mécanisme d'interaction du GAG et d'une protéine ne conduit pas à une liaison au récepteur.

⁴ Stratégie adaptative d'imitation.



FONDAPARINUX



IDRAPARINUX

Figure 5 : Structures du fondaparinux et de l'idraparinux.

Le fondaparinux est un analogue synthétique du pentasaccharide naturel trouvé dans HP. Pour renforcer son affinité pour l'antithrombine, l'idraparinux est O-méthylé et O-sulfaté [82].

Dans ce cas, le complexe protéine/GAG et le récepteur sont spatialement distincts et non compétitifs pour la liaison, ce qui entraîne la formation de complexes ternaires, comme dans le cas de l'IFN- γ , PF4, IL-3, G-CSF et GM-CSF [83]. L'autre mécanisme d'interaction des GAGs solubles implique une liaison compétitive avec des ligands, comme c'est le cas pour la chimiokine IL-8 [84] et la cytokine IL-5 [83]. Les GAGs de surface aident à présenter les chimiokines à leurs récepteurs couplés aux protéines G en augmentant la concentration locale de protéines [85].

L'application pharmaceutique la plus reconnue utilisant les GAGs est l'inhibition de la coagulation et elle a été la première fonction décrite pour les GAGs sulfatés [86]. HP a été découverte en 1917 en raison de sa capacité à prolonger le processus de coagulation du sang, un effet dû à son interaction avec l'inhibiteur naturel de la thrombine, l'antithrombine III (AT-III) [86]. HP est utilisée principalement dans les produits pharmaceutiques comme anticoagulant pour le traitement de la thrombose, la thrombophlébite et l'embolie. Les HPs pharmaceutiques sont généralement issues de poumon bovin ou de la muqueuse intestinale porcine [87]. Le nom HP provient du fait qu'elle a été isolée pour la première fois à partir de cellules de foie canin (du grec *hepar* pour le foie) [88, 89]. De nombreuses sociétés pharmaceutiques, comme Organon et Sanofi-Aventis, ont travaillé au développement de médicaments commerciaux à base de GAGs pouvant lier l'antithrombine et ainsi provoquer une inhibition de la coagulation efficace sans la nécessité d'une administration fréquente comme pour HP. Ces essais ont ensuite conduit à la synthèse de GAG, comme par exemple, le pentasaccharide de synthèse Arixtra[®] (autre nom : fondaparinux, Figure 5) [90] se lie à l'AT et possède une meilleure efficacité que HP à faible dose (avec une demi-vie de 17 h). La structure cristalline du complexe d'Arixtra[®] avec l'AT en l'absence de facteurs de coagulation a été déterminée [91]. La structure cristalline de ce pentasaccharide synthétique complexé à la thrombospondine-1 a également été résolue [92].

Plusieurs autres candidats cliniques ont été développés, tels que l'idraparinux (Figure 5), qui inhibe également de façon sélective le facteur de coagulation Xa et se lie à l'AT [93]. L'idraparinux est actuellement en essais cliniques de phase III pour le traitement de la thromboembolie veineuse. La synthèse de l'idraparinux est beaucoup plus facile que celle de HP ou du fondaparinux. Il montre une plus grande affinité vis-à-vis de l'AT (Kd de 1 nM contre 25 nM pour le fondaparinux) et présente une meilleure efficacité dans des essais *in vitro* que le fondaparinux. Les groupements hydroxyles dans l'idraparinux sont méthylés et les groupements N-sulfate du fondaparinux sont remplacés par des O-sulfate dans l'idraparinux. L'idraparinux a une demi-vie augmentée (120 h) dans le sang. La plus forte activité de l'idraparinux semble être due à la présence de ses éthers de méthyle et de l'IdoA [94].

I.A.4 Limites des connaissances et verrous analytiques

Les glycosaminoglycanes et leurs analogues (naturels ou de synthèse), en tant que principes actifs, semblent être une bonne réponse thérapeutique à certaines pathologies. De nombreux travaux ont pour principal objectif de synthétiser un GAG dans le cadre d'un mimétique. Cependant, à l'heure actuelle, il reste encore de nombreuses questions sur les connaissances acquises dans le domaine de la glycobiologie. Ces questions sont pour la plupart liées aux difficultés analytiques rencontrées.

Idéalement, l'objectif final serait de connaître la structure de tous les GAGs intervenant dans chaque processus, aussi bien physiologique que pathologique. Or, à la différence des protéines, il n'existe pas de code cellulaire pour la biosynthèse des polysaccharides. Les mammifères peuvent synthétiser plus d'une dizaine d'oses dont la structure varie par la présence et la position de différents groupements fonctionnels (hydroxyle, sulfate, amine, acide, acétyle...) augmentant d'autant le nombre d'isomères possibles. De même, la liaison entre les oses peut exister à différents endroits du cycle osidique (1-3 ou 1-4) et ce avec deux anoméries possibles (α ou β). Par conséquent, ils sont difficiles à analyser et c'est pourquoi il faut trouver des alternatives pour étudier ces oligosaccharides.

L'utilisation de techniques biochimiques, structurales et de modélisation moléculaire pour étudier la structure et la fonction des GAGs a permis des progrès significatifs dans la description des propriétés de ces molécules complexes, l'élucidation des sites et séquences pour leur interaction avec les protéines et le développement de mimétiques dans un but thérapeutique. Les résolutions par cristallographie aux rayons X des structures cristallines de divers complexes protéine-GAG ont permis d'obtenir une meilleure caractérisation des propriétés de liaison de HP avec les protéines, les conformations privilégiées et les modes de sulfatation de HP, le rôle des métaux dans ces interactions et l'effet de la modification du pH sur l'affinité de liaison.

La conception réussie et le développement de médicaments mimétiques impliquent la compréhension de l'influence de ces facteurs sur la relation entre la structure du GAG et la nature des interactions protéine/GAG. A l'heure actuelle, très peu de fragments de GAG ont été développés à des fins thérapeutiques, principalement du fait que la synthèse de ces fragments est difficile. Les défis associés à la synthèse des structures complexes de ces oligosaccharides proviennent de la faible disponibilité du L-idose et de l'acide L-iduronique de sources commerciales ou naturelles et le manque de voies de synthèse efficaces pour

réaliser des quantités suffisantes de ces monosaccharides. D'autre part, il faudrait développer une stratégie de protection appropriée pour permettre la mise en œuvre d'un haut degré de fonctionnalisation des fragments d'HP/HS et la formation stéréosélective et efficace des liaisons interglycosidiques dans le squelette carboné des glucides [95].

Lors du développement de molécules à visée thérapeutique et pendant les premières phases cliniques chez l'Homme, des précautions doivent être prises. En effet, la molécule peut engendrer une réaction immunitaire, car non reconnue par l'organisme, ou provoquer des effets secondaires. Dans le cas des mimétiques de GAGs ayant un potentiel thérapeutique, l'idée est toujours d'administrer un "pseudo-GAG" pour moduler l'activité de protéines dont les fonctions sont connues pour être GAGs dépendantes. Dans le cas où les interactions GAGs/protéines visées sont dépendantes de la position des groupements sulfate, HP peut être considérée comme la molécule qui, potentiellement, a le plus d'effets thérapeutiques. En revanche, HP est très peu spécifique et donc peut engendrer différents effets secondaires. Nous pouvons citer, par exemple, les hémorragies non contrôlées ou l'ostéoporose, induits par un traitement prolongé à HP [96-99]. Du point de vue de l'application, on peut également se demander si les oligosaccharides peuvent soigner toutes les pathologies, car les mimétiques des GAGs ont un potentiel thérapeutique très vaste. Nous pouvons citer les mimétiques pour les pathologies suivantes : malaria, cancers, inflammation, inhibition de l'héparanase, réparation tissulaire, et le VIH.

Ces verrous analytiques et ces questions mettent en évidence les difficultés rencontrées aujourd'hui dans l'étude des GAGs et de leurs possibles implications thérapeutiques. Cependant, les avancées technologiques permettent de lever progressivement ces interrogations.

Protéine	Type de protéine	Taille de l'oligosaccharide	K _d
Fibronectine	Protéine d'adhésion	8 à 14-mer	μM [84, 100]
IL-8	Chimiokine	18 à 20-mer	6 μM [101]
PF-4	Chimiokine	12-mer	nM [19]
RANTES	Chimiokine	16 à 18-mer	32 nM [95]
Annexine V	Extracellulaire	8-mer	20 nM [90]
Amyloïde P	Glycoprotéine	4-mer	μM [91]
Thrombine	Protéase	8-mer	7 μM [93]
bFGF	Facteur de croissance	4 à 6-mer	nM [23]
AT-III	Serpine	5-mer (synthèse)	20 nM [102]
HIV-1-gp120	Pathogène viral	10-mer	0,3 μM [38, 103]

Tableau 3 : Caractéristiques de certains complexes protéine/HP connus.

I.B Effets des GAGs sur la fonctionnalité des protéines

Les GAGs interviennent dans de nombreux processus biologiques et ce, de plusieurs manières. Dans ce travail de thèse, nous avons pour objectif de comprendre l'effet des GAGs sur la fonctionnalité des protéines et plus particulièrement les chimiokines, une classe particulière de cytokines.

I.B.1 Interactions des GAGs avec les protéines cibles et leurs effets

De nombreuses études ont permis d'identifier des caractéristiques structurales communes des sites de liaison des protéines aux HP et HS. Différentes approches structurales (RMN, cristallographie et rayons X) et de modélisation moléculaire ont été utilisées pour élucider les caractéristiques tridimensionnelles et les relations structure-activité des interactions protéines/GAGs [104]. Une liste non exhaustive de protéines ayant été cristallisées en complexe avec des oligosaccharides d'HP est présentée dans le Tableau 2. Cette liste regroupe certaines caractéristiques, telles que la longueur optimale requise pour la liaison et les affinités de liaison.

Les glycosaminoglycanes interagissent avec les résidus exposés à la surface des protéines. Les principales interactions entre les GAGs et les protéines sont de type ionique entre les groupements sulfate très acides et les chaînes latérales des résidus arginine, lysine et, dans une moindre mesure, histidine [105]. Il a été démontré que l'arginine a une interaction 2,5 fois plus forte que la lysine pour HP. Des groupes de résidus chargés positivement sur les protéines forment des paires d'ions avec les charges négatives présentes sur les chaînes de HP (groupement sulfate ou carboxyle).

Les interactions des GAGs avec les protéines impliquent également d'autres types d'interactions (y compris les forces de Van der Waals), des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes avec le squelette carboné des glucides. Ainsi, il a été observé que des domaines protéiques liant HP, contiennent des acides aminés tels que l'asparagine et la glutamine capables d'intervenir dans des liaisons hydrogène. L'affinité des protéines pour HP et HS est également renforcée en présence de résidus polaires possédant des chaînes latérales courtes comme la sérine et la glycine. Ces résidus fournissent un minimum de

contraintes stériques et une bonne flexibilité pour l'interaction avec les GAGs [106]. Les interactions hydrophobes peuvent aussi jouer un rôle important dans les interactions protéine/HP. Des études RMN montrent qu'un résidu tyrosine dans un peptide AT synthétique est capable de donner spécifiquement des interactions hydrophobes avec le groupement N-acétyle d'un pentasaccharide d'HP provenant de muqueuse porcine [107].

D'après des analyses statistiques, les résidus Asn, Asp, Glu, Gln, Arg, His et Trp sont plus susceptibles d'intervenir au niveau des sites de liaison que les autres acides aminés lors des interactions entre les protéines et les glucides sulfatés [108-110]. Le résidu aromatique Trp est en moyenne beaucoup plus accessible au solvant que les résidus Asn, Asp, Glu, Gln, Arg et His, tandis que les résidus aliphatiques et hydrophobes Ala, Gly, Ile et Leu, sont généralement enfouis à l'intérieur des protéines, et ne semblent pas participer à la liaison.

L'étude structurale d'un complexe entre un pentasaccharide d'HP et l'antithrombine a montré que les acides aminés basiques participent à cinq ou six interactions ioniques, contribuant à 40% de l'énergie de liaison, tandis que les interactions non-ioniques sont responsables des 60% restants de l'énergie de liaison [111]. Deux résidus aromatiques, Phe 121 et Phe 122, ont un contact direct avec le pentasaccharide. Ces deux résidus ont été respectivement mutés par Ala et Leu, provoquant une diminution d'affinité de HP pour l'AT. Ces résidus semblent donc jouer un rôle crucial dans la liaison de HP à travers des interactions hydrophobes et de VDW [111]. Les résidus basiques Arg 47, Lys 114, Lys 125 et Arg 129 ont été identifiés comme les plus importants au niveau du site de liaison [112-115]. Ces résidus participent à des interactions ioniques avec les groupements chargés négativement de HP, comme observé dans la structure cristalline d'un complexe AT/pentasaccharide [116]. Les résidus Arg 129, Lys 114 et Arg 47 [45, 111, 117] sont critiques pour le changement de conformation de l'antithrombine induit par HP, contribuant à une affinité élevée [115].

La résolution des structures cristallines de nombreuses protéines interagissant avec les GAGs a contribué à montrer l'existence de séquences protéiques consensus pour la liaison avec les GAGs. Par exemple, la séquence WQPPRARI et la séquence WSPW ont été identifiées comme les motifs de liaison à HP, respectivement, de la région C-terminale de la fibronectine et de la thrombospondine [118, 119]. Cardin et Weintraub [120] ont analysé les structures de vingt-et-une protéines liant HP et ont proposé que les sites caractéristiques liant HP avaient la séquence XBBXB ou XBBBXXB, où B est une lysine ou arginine (His très rarement) et X est un résidu neutre. Les résidus Asn, Ser, Ala, Gly, Ile, Leu et Tyr sont

les plus fréquents en position X. Les résidus tels que Cys, Glu, Asp, Met, Trp et Phe sont très peu représentés dans les domaines en hélice α ou feuillet β des protéines liant HP.

Les acides aminés basiques de la séquence XBBBXXBX, quand ils appartiennent à une hélice α , sont habituellement situés sur l'extérieur de la protéine formant un arrangement en hélice amphipathique⁵ (Figure 6A). Une analyse comparative des séquences de liaison a montré que les acides aminés basiques sont généralement distants d'environ 20 Å (Figure 6B) dans une structure hélicoïdale amphipathique, et la même disposition spatiale est préservée dans une structure en feuillet β [121]. Par exemple, les groupement sulfate dans la structure cristalline de l'artémicine⁶ [122] sont distants d'environ 8-9 Å et sont disposés aux sommets d'un triangle équilatéral approximatif dans la pré-hélice (avec une séquence consensus XBBXBX) et les régions amino-terminales. Une troisième séquence consensus a été proposée comme liant HP : XBBBXXBBBXXBBX, où B représente un résidu cationique [123]. Il convient de noter que l'espacement entre des groupements de résidus basiques peut aussi fournir des indices sur les sites de liaison de HP pouvant être importants pour les interactions avec les GAGs. Ces informations peuvent faciliter la conception de peptides liant efficacement HP [124].

Les sites de liaison des glycosaminoglycanes sont souvent conservés entre les protéines. Cependant, il existe des cas particuliers comme ceux observés chez les chimiokines, qui ont une grande similitude de structure, mais ne partagent pas de régions communes de liaison [125]. PF 4 et IL-8 sont membres de la famille des chimiokines α et ont une structure monomérique tridimensionnelle très similaire, avec des feuillets β antiparallèles et une hélice α à l'extrémité C-terminale. PF4 possède une séquence consensus KKIIKK, où K est la lysine et I est une isoleucine. La séquence consensus dans le domaine équivalent de IL-8 est KENWVQRVVEKFLKR et est responsable de la liaison pour HP/HS. Les protéines liant HP/HS de la famille des chimiokines β utilisent un motif structural différent, KRNR.

⁵ Possède à la fois un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe

⁶ Facteur de croissance nerveux chez l'homme

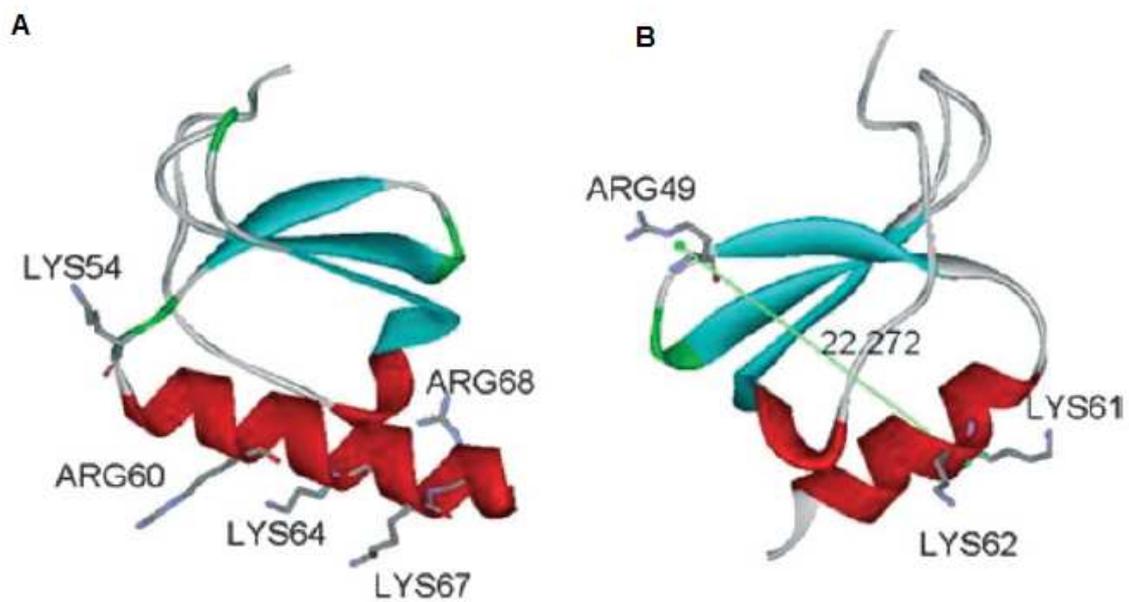


Figure 6 : Exemple d'une séquence consensus.

(A) Motif linéaire XBBBXXBX avec les résidus basiques arginine et lysine (bleu) orientés sur une surface de l'hélice (vert, résidus 53–72), basés sur la structure de l'interleukine-8 (code PDB 3IL8). (B) Motif linéaire avec les résidus basiques arginine et lysine (bleu) séparés d'une distance de 20 Å, localisés sur des surfaces opposées (vert, résidus 48–50 et 60–62), comme observé dans la structure du facteur plaquettaire-4 (code PDB HPF4).

L'interaction d'une protéine et d'un glycosaminoglycane entraîne dans de nombreux cas un changement conformationnel de la protéine. C'est le cas par exemple de l'AT-III qui subit, lors de son interaction avec HP, un changement de conformation afin de catalyser l'inhibition du facteur Xa. L'interaction d'un GAG permet également l'oligomérisation de certaines protéines, c'est le cas notamment des chimiokines (I.B.3.2). Dans certains cas, les protéines s'oligomérisent par elles-mêmes. Cependant, cette association peut être promue par l'interaction avec un GAG.

I.B.2 Rôle du pH dans la liaison

Certaines interactions HP/HS-protéines sont régulées *in vitro* par le pH. Une modification du pH peut avoir des effets sur la capacité de certaines protéines à lier HP ou HS. C'est le cas par exemple du peptide de synthèse de l'amyloïde bêta [126], la sélénoprotéine P [127], le facteur de croissance granulocytaire [117], SDF-1 [128]. L'effet de la modification du pH se pose tout particulièrement lorsque le site de liaison du GAG dans une protéine contient des histidines, du fait du pKa des chaînes latérales de ces acides aminés proche de la neutralité (pKa d'environ 6). Par conséquent, si le pH physiologique s'approche de 6, une proportion importante des histidines sera protonée et donc chargée positivement, favorisant ainsi la formation d'interactions électrostatiques avec les groupements sulfates chargés négativement du GAG.

Un autre exemple est celui de MCP-6. La modélisation moléculaire de MCP-6 a identifié quatre résidus dépendants du pH (His 35, His 106, His 108 et His 238) intervenant dans l'interaction de la protéine avec HP [129]. La nature électropositive de la surface de la protéase est due à la présence d'histidines protonées qui peuvent interagir avec les GAGs. La glycoprotéine riche en histidine et en proline (HPRG) est un autre exemple dans lequel la liaison à HP est minimale à pH neutre, mais augmente rapidement jusqu'à un maximum à pH 6,5 [130]. À un pH intermédiaire, la protonation des histidines et la liaison de zinc favorisent l'interaction de HPRG avec HP.

I.B.3 Les chimiokines, des cytokines particulières interagissant avec les GAGs

Les cytokines, terme introduit en 1974 par Stanley Cohen, forment un groupe très diversifié de molécules solubles sécrétées dans l'organisme. Ce groupe, généralement nommé « grande famille » ou encore « superfamille », est constitué de peptides, de protéines et de glycoprotéines possédant une masse moléculaire comprise entre 8 et 30 kDa⁷. Les cytokines interviennent directement dans les interactions entre les cellules régulant ainsi les fonctions cellulaires et tissulaires. Les cytokines provoquent souvent la sécrétion d'autres cytokines engendrant ainsi une réponse en cascade. Les effets résultant de ces sécrétions peuvent être inhibiteurs ou additionnés et dans certains cas synergiques.

Les cytokines jouent un rôle important dans la coordination du développement embryonnaire, la croissance cellulaire, la maturation, la réparation et guérison de plaies, la réponse immunitaire, l'angiogenèse⁸ et l'hématopoïèse⁹. Récemment, des études ont également porté sur le rôle des cytokines dans le lien entre le corps et l'esprit, comme c'est le cas dans une étude nommée psycho-immunologique [131-133].

Toutes les cellules humaines sont probablement capables de produire certaines cytokines par des voies de sécrétion. Quand elles sont sécrétées, les cytokines ne sont généralement pas stockées dans les cellules. De nombreuses cytokines sont libérées sous forme active ou sous forme de précurseurs inactifs nécessitant une activation. Les formes actives des cytokines interagissent avec des récepteurs spécifiques afin de déclencher les processus dans lesquels elles interviennent. Elles exercent donc leurs actions sur un nombre important de cellules cibles (action pléiotropique) en interagissant avec affinité et spécificité. Ces interactions mènent à des régulations à différents niveaux. La régulation peut être : (1) autocrine : une cytokine produite par une cellule agit sur son propre récepteur, (2) paracrine : la cytokine d'un type cellulaire interagit avec les récepteurs d'autres types cellulaires voisins, ou (3) endocrine : la cytokine agit sur des cellules ou tissus distants.

⁷ Dalton (Da) unité de masse des atomes utilisé en biochimie (1 Da équivaut à 1 g.mol⁻¹)

⁸ Formation de nouveaux vaisseaux sanguins

⁹ Création et renouvellement des cellules sanguines

Certaines cytokines partagent des séquences homologues en acides aminés et possèdent une structure tertiaire (tridimensionnelle) commune. Cependant la majorité des cytokines actives a une structure spécifique. Cette caractéristique n'est donc pas à la base de la classification des cytokines. La méthode de regroupement des cytokines reflète souvent la voie biologique historique dans laquelle elle a été découverte. Le Tableau 4 présente les différentes familles de cytokines. Les cytokines classées par familles peuvent ainsi être regroupées selon leurs fonctions, c'est-à-dire selon le type de voie biologique dans laquelle elles interviennent : e.g. les cytokines de l'hématopoïèse, de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Les cytokines hématopoïétiques sont responsables de la prolifération et la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse. La réponse immunitaire est un exemple de cascade dans laquelle interviennent différentes cytokines qui orientent le type de réponse à la suite d'une infection (e.g. les cytokines IL-2, IFN γ , IL-12). Les cytokines de l'inflammation sont divisées en deux catégories : les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF α) et anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13). Cette classification n'exclue pas de nombreux chevauchements, et certaines cytokines structurellement différentes peuvent partager le même récepteur. Par exemple IL-6, IL-11, et le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) partagent le même récepteur glycoprotéique [134]. Les récepteurs ont aussi été utilisés pour classer les cytokines [135].

Les cytokines interviennent donc dans de nombreux processus physiologiques mais également pathologiques, tels que l'infection par le VIH [136] et le cancer [137]. On découvre un nombre croissant de cytokines impliquées dans les pathologies malignes. Les cytokines impliquées dans la régulation de la croissance et la prolifération des cancers [138] ou cellules cancéreuses peuvent être produites de manière constitutive. Ces cytokines peuvent agir sur les cellules malignes de manière autocrine ou sur les tissus de soutien, tels les fibroblastes et les vaisseaux sanguins afin de créer un environnement propice à la croissance du cancer. Il y a cependant une grande diversité de cytokines associées aux différents types de cancers. La plupart des études menées sur les cytokines et le cancer ont été réalisées *in vitro* dans des lignées cellulaires ou *in vivo* chez l'animal. Les mesures *in vitro* chez les humains atteints du cancer ont souvent mis en évidence une seule cytokine. Cependant, des taux élevés de cytokines différentes ont été décrits dans le sang, l'épanchement pleural et l'urine des patients, dont IL-1 [139], IL-6 [140-147], TNF α [148-151], FGF [152-154], TGF [155] et G-CSF [156].

Familles de cytokines	Exemples	Commentaires
Interleukines (IL)	IL-1, IL-2, IL-10...	Ex : IL-1 : secrétée par les macrophages, elle induit la phase de réaction aiguë suite à une inflammation
Facteurs de nécrose (TNF)	TNF α	Provoquent des lésions tissulaires pour les voies gastro-intestinales, les reins et les poumons lors de la septicémie
Facteurs de stimulation de colonies (CSF)	G-CSF, GM-CSF	Jouent un rôle dans l'hématopoïèse, mais peuvent aussi activer les leucocytes matures
Facteurs de croissance (GF)	TGF, FGF IGF...	Impliqués dans la cicatrisation et dans le contrôle négatif de l'inflammation
Interférons (IFN)	IFN α , IFN β , IFN γ	Antiviraux, possédant des propriétés anti-oncogéniques et activant les macrophages et lymphocytes
Chimiokines	SDF-1 α , MCP-1, RANTES...	Cytokines ayant une action chimiotactique

Tableau 4 : Les différentes familles de cytokines.

Les cytokines sont également impliquées dans les processus de reconnaissance cellulaire et de recrutement cellulaire. Ces deux processus, intimement liés, sont très sélectifs et sont déclenchés par des cytokines possédant une propriété très particulière, à savoir le chimiotactisme. On parle alors de cytokines chimiotactiques¹⁰. Cette classe particulière de cytokines, portant le nom de **chimiokines** (terme dans lequel on retrouve chimiotactisme et cytokines), regroupe toutes les cytokines aux propriétés chemoattractantes, attirant spécifiquement certaines populations de cellules circulantes. Depuis d'autres fonctions ont été décrites pour ces cytokines, notamment la possibilité d'interagir spécifiquement avec des oligosaccharides sulfatés, à savoir les glycosaminoglycanes (GAGs), lors des processus physiologiques et pathologiques.

I.B.3.1 La famille des chimiokines

Les chimiokines représentent une famille de petites protéines secrétées, dont la séquence contient 4 résidus cystéine conservés [157, 158]. Plus de 40 chimiokines ont été identifiées chez les humains. Ces protéines activent les récepteurs couplés aux protéines G et induisent la migration des cellules à travers un gradient de concentration. Les chimiokines possèdent deux noms, dont l'un correspond à la nomenclature internationale (Tableau 5). Nous utiliserons dans la suite de ce manuscrit préférentiellement la nomenclature fonctionnelle.

Le rôle des chimiokines est de promouvoir l'accumulation de cellules à la source de la production des chimiokines. La plupart des chimiokines sont homéostatiques par nature et sont produites et secrétées de façon constitutive. Ces protéines possèdent une variété de fonctions, elles dirigent par exemple le trafic des lymphocytes à travers les tissus. Elles sont également impliquées dans la surveillance et la fonction immunitaire pour localiser les cellules T ou B dans le système lymphatique [159]. D'autres chimiokines sont considérées comme inflammatoires et sont uniquement produites par les cellules durant l'infection ou un stimulus pro-inflammatoire. Le rôle des chimiokines inflammatoires est d'induire la migration des leucocytes au site infecté. De plus, les chimiokines inflammatoires activent les cellules pour une réponse immunitaire et initient la cicatrisation des plaies. Le rôle des chimiokines est très complexe et est dépendant du contexte physiologique.

¹⁰ Se dit d'une cellule qui présente une réaction d'orientation à un facteur chimique de son environnement. Si la réponse est positive, la cellule s'oriente vers ce facteur chimique.

Famille	Nom systématique (international)	Nom fonctionnel
CXC	CXCL1	Gro- α /MGSA- α
	CXCL2	Gro- β /MGSA- β
	CXCL3	Gro- γ /MGSA- γ
	CXCL4	PF-4
	CXCL5	ENA-78 (LIX)
	CXCL6	GCP2
	CXCL7	NAP-2, CTAP-III
	CXCL8	IL-8
	CXCL9	MIG
	CXCL10	IP-10
	CXCL11	I-TAC
	CXCL12	SDF-1 α/β
	CXCL13	BCA-1 (BLC)
	CXCL14	BRAK/Bolekine
	CXCL15	(Lungkine)
	CXCL16	small inducible cytokine B6
C	XCL1	Lymphotactine
	XCL2	SCM-1b
CX3C	CX3CL1	Fractalkine (neurotactine)
CC	CCL1	I-309 (TCA-3)
	CCL2	MCP-1
	CCL3	MIP-1 α
	CCL4	MIP-1 β
	CCL5	RANTES
	CCL6	C-10/MRP-2
	CCL7	MCP-3
	CCL8	MCP-2
	CCL9 / 10	MIP-1 γ /MRP-2
	CCL11	Eotaxine-1
	CCL12	MCP-5
	CCL13	MCP-4
	CCL14	HCC-1
	CCL15	HCC-2/MIP-5
	CCL16	HCC-4/LEC
	CCL17	TARC (ABCD-2)
	CCL18	MIP-4/AMAC-1
	CCL19	MIP-3 β /Exodus-3
	CCL20	MIP-3 α /Exodus-1
	CCL21	6Ckine/Exodus-2
	CCL22	MDC/STCP-1
	CCL23	MIPF-1/MIP-3/CK β -8
	CCL24	MPIF-2/Eotaxine-2
	CCL25	TECK
	CCL26	Eotaxine-3
	CCL27	CTACK
	CCL28	MEC

Tableau 5 : Nomenclatures des chimiokines.

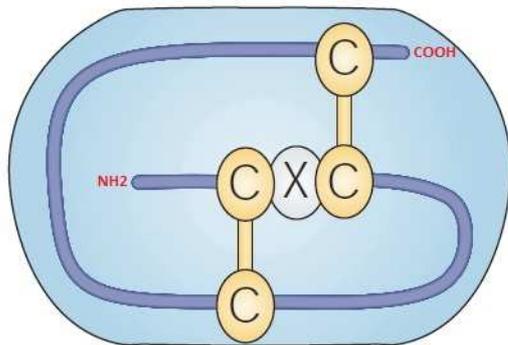
Le chimiotactisme cellulaire, migration des cellules à travers un gradient de concentration, est la fonction la plus connue des chimiokines. Cependant, elles peuvent avoir d'autres rôles. Récemment, le mécanisme de transduction du signal [160] et de nouvelles fonctions [161-164] des chimiokines, comme par exemple la régulation de la différenciation des cellules T ont été décrits.

L'activité des chimiokines est initiée par la liaison à un récepteur couplé aux protéines G spécifique. Un modèle en deux étapes a été proposé pour l'activation du récepteur, dans lequel le corps principal de la chimiokine reconnaît et lie le récepteur lors de la première étape. Ceci est suivi d'un changement conformationnel de la partie N-terminale flexible de la chimiokine [165]. Ce changement conformationnel permet à cette partie N-terminale de réaliser les interactions nécessaires avec le récepteur menant à l'activation de la chimiokine. Cette activation est suivie d'une conversion de GDP en GTP par la sous-unité α des protéines G. Les protéines G se dissocient du récepteur et activent plusieurs molécules effectrices en aval, ce qui conduit à une cascade de signalisation dans le cytoplasme de la cellule [160]. Cette séquence d'événements conduit à divers processus physiologiques incluant la migration des leucocytes et leur trafic, la dégranulation des leucocytes, la différenciation cellulaire, et l'angiogenèse [163, 164, 166], bien que les chimiokines soient traditionnellement associées au développement et à la réponse du système immunitaire.

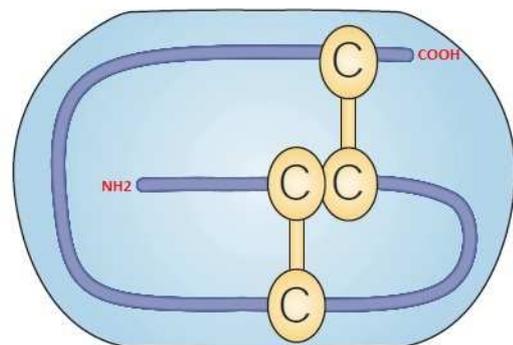
Les chimiokines ont donc un rôle central dans le processus de migration des leucocytes, ce qui inclut de multiples étapes impliquant des interactions entre molécules d'adhésion et la fonction chimioattractante de ces protéines [167, 168]. La maturation des cellules B et T implique plusieurs chimiokines à différents stades du développement [163, 169, 170]. Les chimiokines impliquées dans la maturation des cellules B incluent SDF-1 α et son récepteur CXCR4 [171], BCA-1 et MIP-3 α [164].

Les chimiokines agonistes et les récepteurs régulant la maturation des cellules T impliquent MCP-1, MIP-1 α , RANTES, et les récepteurs CCR2 et CCR5 [163]. Plusieurs chimiokines régulent la migration des monocytes et des cellules dendritiques (DCs) immatures exprimant des récepteurs à chimiokines comme CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7 et CXCR2 [172-175]. L'expression de ces récepteurs est régulée dans les cellules dendritiques. Les chimiokines inflammatoires provoquent le recrutement et la localisation des cellules dendritiques aux sites de l'inflammation. La biologie des chimiokines est intrinsèquement liée aux activités d'autres cytokines, comme par exemple la fonction de MCP-1 sur la polarisation des cellules T auxiliaires [176].

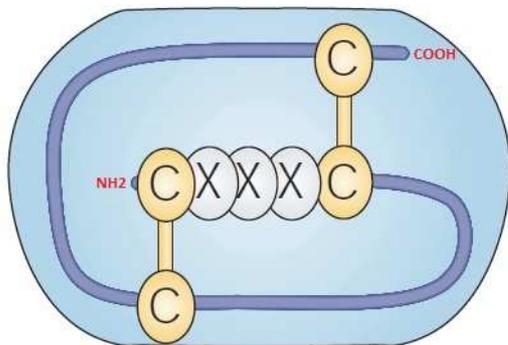
a Chimiokines CXC



b Chimiokines CC



c Chimiokines CX₃C



d Chimiokines C

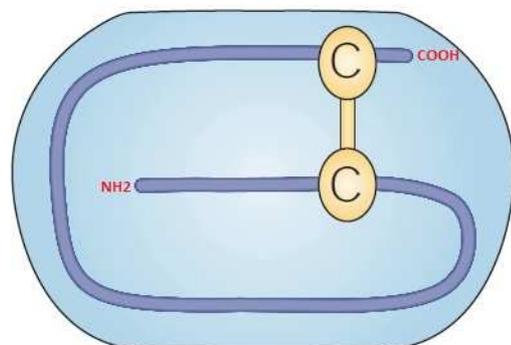


Figure 7 : Structures des chimiokines.

[177]

Les chimiokines possèdent 4 résidus cystéines invariants formant des ponts disulfures. La première cystéine dans la séquence forme une liaison covalente avec la troisième et la seconde avec la quatrième cystéine. La famille des chimiokines peut aussi être classifiée sur la base de la séquence locale contenant les deux premières cystéines. Les chimiokines ayant un acide aminé entre les deux premières cystéines sont sous-classées comme CXC ou chimiokines alpha (Figure 7a). On distingue deux groupes parmi cette sous-famille : l'un possède une séquence de trois acides aminés ELR avant la première cystéine et l'autre en est dépourvu. La présence de ce motif oriente l'action des chimiokines vers les neutrophiles, alors que l'absence de ce motif permet aux chimiokines d'agir sur les monocytes, les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques, les polynucléaires basophiles et éosinophiles. Si les deux premières cystéines sont adjacentes, les chimiokines sont alors dites de type CC ou chimiokines bêta (Figure 7b). Ces chimiokines agissent sur les monocytes, les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques, les cellules NK (Natural Killer), et les polynucléaires basophiles et éosinophiles.

Une autre famille, CX3C ou chimiokine gamma, comprend seulement une protéine (la fractalkine) dans sa catégorie, et est définie par trois résidus entre les deux premières cystéines. Cette protéine exerce son rôle chemoattractant sur les lymphocytes T et les monocytes. C'est le seul membre des chimiokines à pouvoir être inséré dans une membrane *via* son domaine mucine (Figure 7c) [158, 178]. Une des deux exceptions au paradigme des quatre cystéines est la C ou chimiokine delta, dans laquelle le polypeptide a seulement deux cystéines (Figure 7d). Le même gène code les deux membres de cette sous-famille. Il présente différents sites d'épissage mais les deux protéines diffèrent seulement par deux acides aminés.

La structure des chimiokines se compose d'une extrémité N-terminale allongée qui précède la première cystéine (Figure 8). Cette extrémité étendue n'a pas de structure caractéristique, et dans la plupart des cas, n'est pas observable même dans des études de haute résolution structurale (RMN ou rayons X). Après les deux premières cystéines, il y a une boucle d'une dizaine de résidus qui, dans de nombreux cas, est suivie par une hélice 3_{10} . La région entre la seconde cystéine et l'hélice est connue sous le nom de boucle N et joue un rôle fonctionnel important. L'hélice 3_{10} est suivie de trois feuillets β et une hélice α C-terminale. Chaque unité de structure secondaire est reliée par des boucles (30s, 40s et 50s) reflétant le nombre de résidus dans la protéine mature.

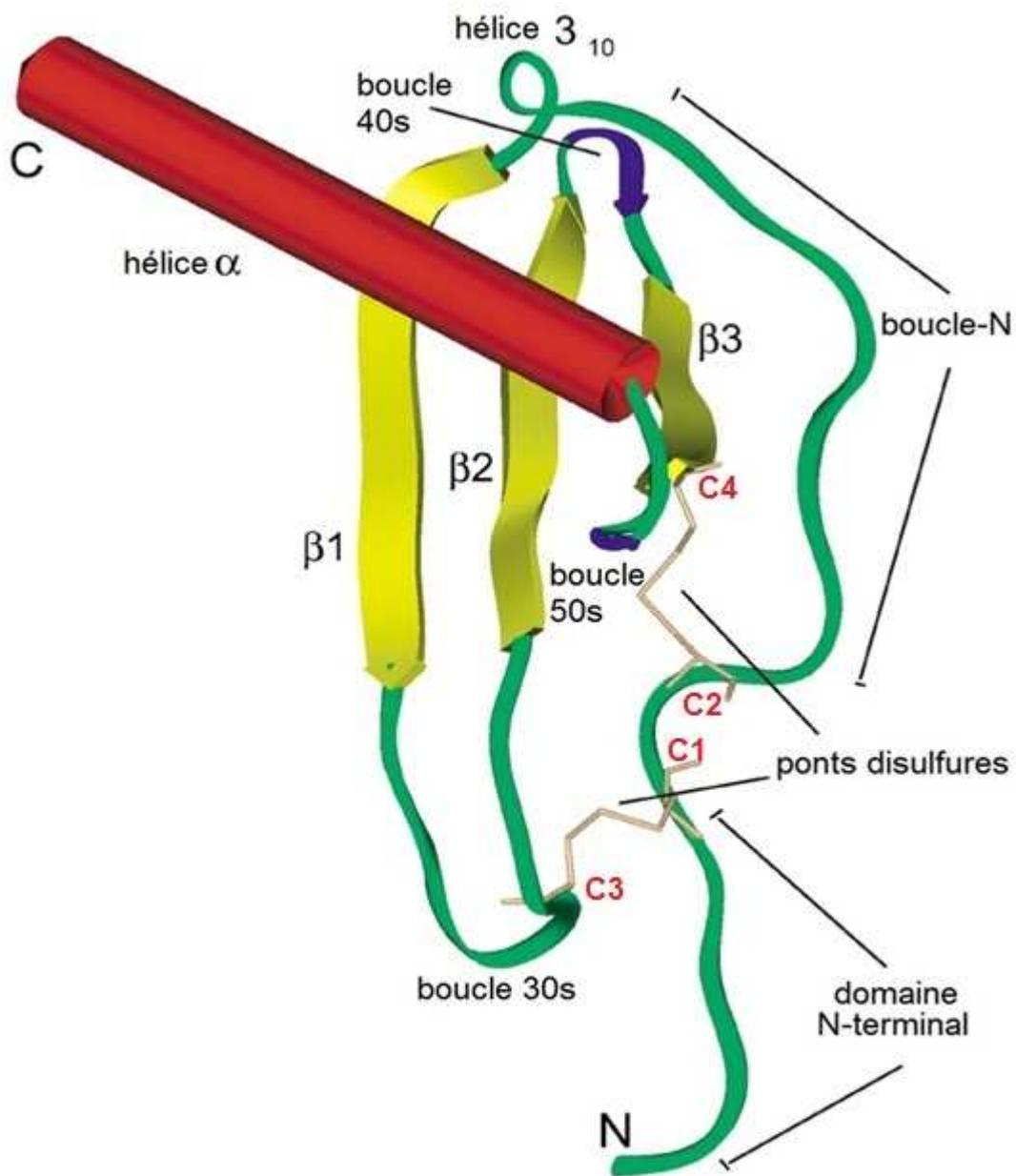


Figure 8 : Monomère de la chimiokine IL-8 avec ses différents éléments de structure secondaire.

[179]

On connaît bien la structure tertiaire des chimiokines grâce aux études par RMN et cristallographie [179-186]. Paradoxalement, malgré la diversité de leurs fonctions et séquences, la plupart des chimiokines ont un repliement tertiaire commun comme représenté par la structure du monomère de la chimiokine IL-8 (Figure 8).

La forte homologie de structure chez les chimiokines est partiellement due à la présence des ponts disulfure et des interactions hydrophobes qui définissent et stabilisent une grande partie de l'architecture de ces protéines. L'effet important des ponts disulfure n'est pas universel pour les chimiokines. Contrairement à IL-8, la chimiokine IP-10 conserve son activité après la réduction des ponts disulfure et leur alkylation [187]. Dans la famille C, il n'y a qu'un seul pont disulfure entre Cys 11 et Cys 48, ce qui par exemple pour la lymphotactine n'est apparemment pas suffisant pour stabiliser sa structure. Des tentatives de synthèse, par voie chimique ou biologique, de la lymphotactine ont conduit dans chacun des cas à une protéine déroulée. Pourtant, les deux protéines synthétique ou recombinante, étaient actives dans des tests de chimiotactisme. Plus récemment, la lymphotactine contenant 8 sites O-glycosylés a été synthétisée [188]. Ces sites de glycosylation permettent de stabiliser la structure tridimensionnelle de la protéine. Il est possible que les protéines de la famille C soient stabilisées *in vivo* seulement en présence d'autres molécules, incluant leur récepteur.

I.B.3.1.2 Oligomérisation des chimiokines

Si certaines chimiokines comme MCP-3 sont monomériques [180], de nombreuses chimiokines se dimérisent en solution, et certaines études suggèrent une forte corrélation entre la famille des chimiokines et le motif de dimérisation. Bien que l'idée générale soit que l'unité fonctionnelle de la chimiokine est le monomère, les différentes structures quaternaires identifiées pour les chimiokines CXC, CC et CX3C pourraient expliquer la reconnaissance stricte des récepteurs dans une sous-famille. La chimiokine CXC IL-8 forme un dimère en solution et sous forme cristalline (Tableau 6). Les chimiokines CXC se dimérisent souvent dans des structures ressemblant à IL-8 grâce aux interactions entre leurs résidus dans le premier feuillet β (Figure 9C). En revanche, de nombreuses chimiokines CC se dimérisent dans des structures de forme allongée comme MCP-1 (Figure 9A et B) avec des interactions médiées par des résidus à proximité du domaine N-terminal, et qui sont en grande partie non structurés dans le monomère.

Famille	Chimiokine	Cristallographie	RMN
CXC	CXCL1 / Gro α		Dimère [193]
	CXCL2 / Gro β		Dimère [194]
	CXCL4 / PF-4	Tetramère [189]	Tetramère [195]
	CXCL7 / NAP-2	Tetramère [190]	Monomère [196]
	CXCL8 / IL-8	Dimère [191]	Dimère [197]
	CXCL12 / SDF-1	Dimère [192]	Monomère [165]
CC	CCL1 / I-309		Monomère [201]
	CCL2 / MCP-1	Dimère [198]	Dimère [184]
	CCL3 / MIP-1 α		Monomère [202]
	CCL4 / MIP-1 β		Dimère [182]
	CCL5 / RANTES		Dimère [203]
	CCL7 / MCP-3		Monomère [180]
	CCL8 / MCP-2	Monomère [199]	
	CCL11 / Eotaxine-1		Monomère [204]
	CCL15 / MIP-5		Monomère [205]
	CCL23 / MIP-3		Monomère [206]
	CCL24 / Eotaxine 2		Monomère [207]
	CCL27 / CTACK	Dimère [200]	Monomère [208]
CX ₃ C	CX ₃ CL1 / Fractalkine	Dimère [209]	Monomère [181]

Tableau 6 : Liste des chimiokines avec leur structure tridimensionnelle connue.

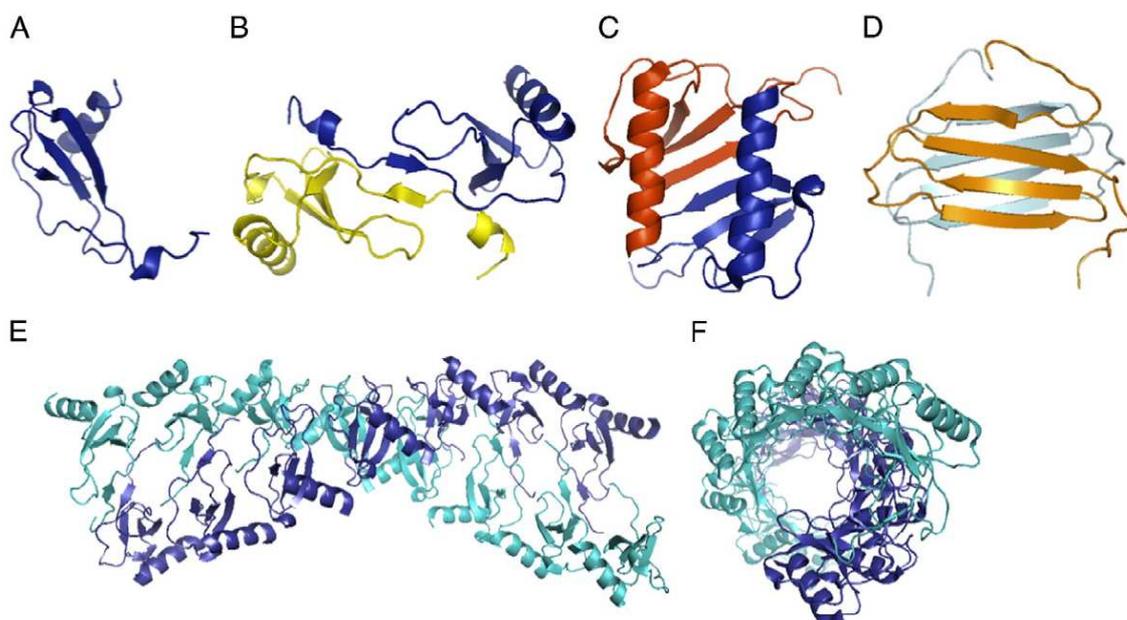


Figure 9 : Structures cristallographiques de chimiokines.

(A) Structures monomérique et (B) dimérique de la chimiokine MCP-1 [210]. (C) Structure dimérique de IL-8 [197]. (D) Dimère non canonique de la lymphotactine [211]. (E et F) Forme polymérique de MIP-1 α sur le côté et face à l'axe hélicoïdal [212].

La chimiokine virale CC, VMIP-II, cristallise sous forme de dimère [200] mais est monomérique en solution [208], tout comme SDF-1. De même, la fractalkine est monomérique en solution [181], mais elle s'associe en une structure dimérique cristalline unique [209]. Enfin, dans certaines conditions en solution, la lymphotactine peut former un dimère dans lequel la structure de la lymphotactine est totalement différente de la structure tertiaire standard des chimiokines [213]. Les différentes structures quaternaires pourraient très bien expliquer la rare réactivité croisée de l'activation des récepteurs entre les différentes sous-familles de chimiokines.

Les deux modes de dimérisation qui distinguent les chimiokines CXC des CC sont attribués à des différences dans la topologie de la surface électrostatique entre les deux sous-familles. Il y a plus de résidus hydrophobes (80%) dans le premier feuillet bêta des chimiokines CXC que dans les chimiokines CC (40%) [157, 214, 215]. Les chimiokines CXC sont donc plus enclines à se dimériser en utilisant le premier feuillet bêta comme interface entre les monomères, ce qui diminue ainsi l'exposition des chaînes apolaires latérales des résidus dans cette région. Il est intéressant de noter que, malgré la diminution du nombre total de résidus hydrophobes, les chimiokines CC ont plus de résidus avec des chaînes latérales aromatiques dans cette région que les chimiokines CXC. Dans la plupart des chimiokines CC, les résidus à proximité des deux premières cystéines sont hydrophobes, en particulier ceux intervenant dans les dimères de MIP-1 β , RANTES et VMIP-II. Il convient de noter, toutefois, que l'interface des dimères de chimiokines CC est constituée d'une combinaison d'interactions hydrophobes et de liaisons électrostatiques.

Les structures de MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES ont d'abord été décrites comme des dimères. En plus des dimères, plusieurs chimiokines forment des oligomères d'ordre supérieur seules, ou du fait de la liaison aux GAGs [216, 217] (I.B.3.2). Par exemple, la chimiokine PF4 forme un tetramère stable en solution en présence de HP [189]. Cependant, ces structures ont été déterminées à faible pH en vue de déstabiliser les oligomères d'ordre supérieur formés en solution [182, 218]. Récemment, les structures cristallines de MIP-1 α et MIP-1 β ont été déterminées à pH physiologique et ont révélé une structure en forme de tige (Figure 9E et F) [212]. Les chimiokines adoptent donc un large éventail d'états oligomériques. De plus, la stabilité des oligomères varie de façon étonnante. Les chimiokines RANTES, MIP-1 β et MIP-1 α sont très stables sous forme de grands oligomères, alors que les chimiokines MCP-1 et SDF-1 « basculent » facilement des formes monomériques à dimériques en fonction des conditions en solution [128, 219], CTACK passe du monomère au tetramère mais seulement à des concentrations millimolaires indiquant une forte constante de dissociation [220], et MCP-3 ne montre aucune tendance à l'oligomérisation [180].

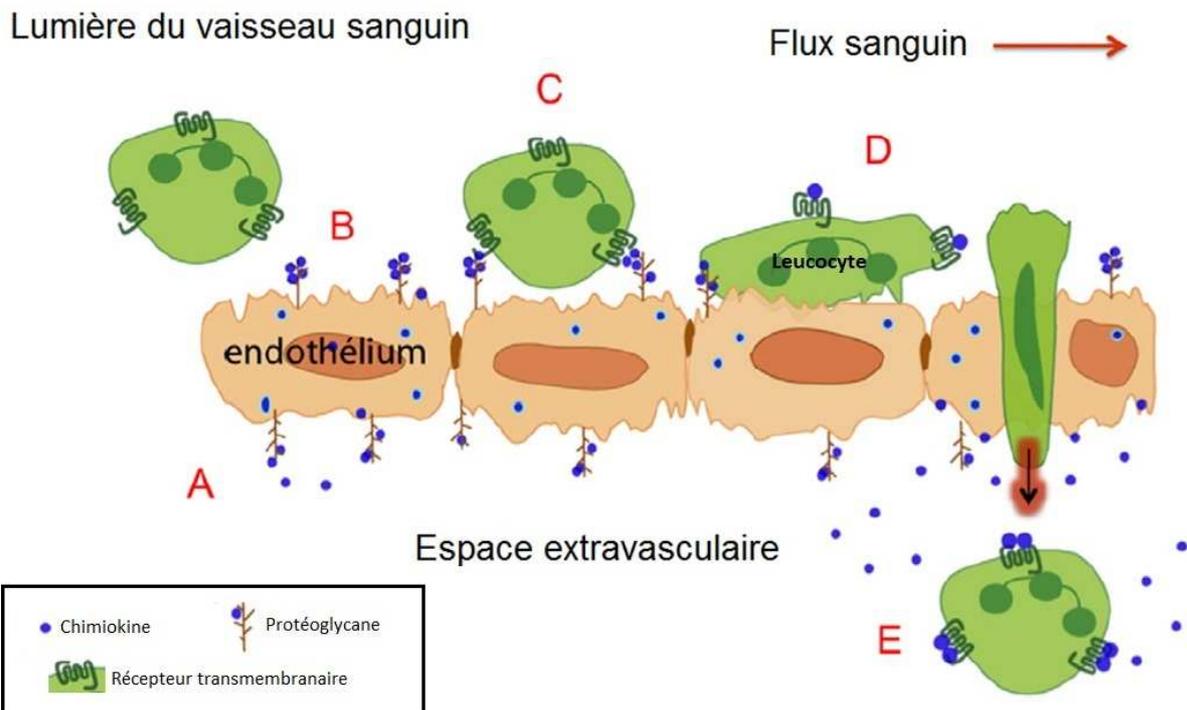


Figure 10 : Schéma illustrant les étapes dans la migration cellulaire où de nombreuses chimiockines et d'interactions peuvent entrer en jeu.

(A) Les chimiockines sécrétées dans l'espace extravasculaire lient les GAGs et sont transcytosée vers la lumière de l'endothélium où (B) elles sont présentées sur la surface de l'endothélium aux récepteurs des leucocytes dans le sang. Beaucoup de chimiockines s'oligomérisent autour des GAGs bien qu'il y ait d'autres mécanismes de transport et de présentation. (C) Les chimiockines se lient aux récepteurs, dans certains cas causant l'arrêt des leucocytes et l'adhésion et il existe des preuves que les formes oligomériques des chimiockines sont impliquées dans ce processus. (D) Les formes monomériques des chimiockines provoquent les mouvements cellulaires. (E) Après l'extravasation, les chimiockines oligomériques peuvent fournir des signaux d'arrêt comme il l'a été suggéré pour un dimère de SDF-1, ou elles peuvent causer l'activation des leucocytes comme cela a été démontré pour RANTES. D'après [221].

Les constantes de dissociation des oligomères de chimiokines sont habituellement dans la gamme du micromolaire et sont toujours supérieures aux concentrations physiologiques mesurées dans le sérum, qui sont dans la gamme du nanomolaire [222, 223]. Une activité maximale est détectée à une concentration nanomolaire *in vitro*, ce qui suggère que toutes les chimiokines sont actives sous forme monomérique. Il reste cependant à savoir si les oligomères possèdent une activité *in vivo*. Toutefois, les chimiokines s'agrègent en présence de certaines molécules comme les glycosaminoglycanes (GAGs) incluant HP et les protéoglycanes [224]. Cette agrégation pourrait les protéger de la protéolyse, les faire participer au mécanisme de formation du gradient chimiotactique, en libérant les chimiokines sécrétées, et les faire participer à la reconnaissance et à la présentation de certaines chimiokines à leurs récepteurs pour une activité maximale. Les protéines G couplées aux récepteurs ont récemment été observées sous forme de dimères [160, 225]. Cependant, le rôle de l'oligomérisation des chimiokines n'est pas encore totalement connu.

Quelle est donc la fonction des oligomères de chimiokines? Compte tenu de la prédominance des chimiokines qui s'oligomérisent, la constatation que les mutants monomériques sont entièrement fonctionnels dans des essais de chimiotactisme est surprenante. L'immobilisation des chimiokines à la surface des cellules peut être nécessaire *in vivo* pour empêcher leur diffusion en présence du flux sanguin, mais n'est pas nécessaire dans les essais *in vitro* en absence de flux. En outre, certaines chimiokines peuvent avoir besoin d'être transportées à travers l'endothélium pour une présentation correcte à la surface cellulaire et les leucocytes peuvent nécessiter l'activation des intégrines pour l'arrêt et l'adhérence *in vivo* (Figure 10).

Proudfoot et ses collègues ont montré que des chimiokines sauvages et des mutants ne pouvaient pas s'oligomériser entre elles, dans un modèle *in vivo* impliquant le recrutement dans la cavité péritonéale de souris [226]. Dans cet essai, les chimiokines et les mutants ont été injectées dans le péritoine de souris, et le nombre de cellules, ayant migré dans la cavité, a été quantifié après plusieurs heures. Ces études ont clairement démontré l'échec des mutants monomériques des chimiokines MCP-1, MIP-1 β et RANTES à induire la migration *in vivo*, et ce, même si elles ont montré un chimiotactisme *in vitro*, indiquant un rôle fonctionnel. Ces données suggèrent que, bien que la liaison de chimiokines sauvages monomériques à des récepteurs soit suffisante pour induire le mouvement des cellules, d'autres étapes dans le processus global de la migration doivent impliquer des formes oligomériques, du moins pour certaines chimiokines.

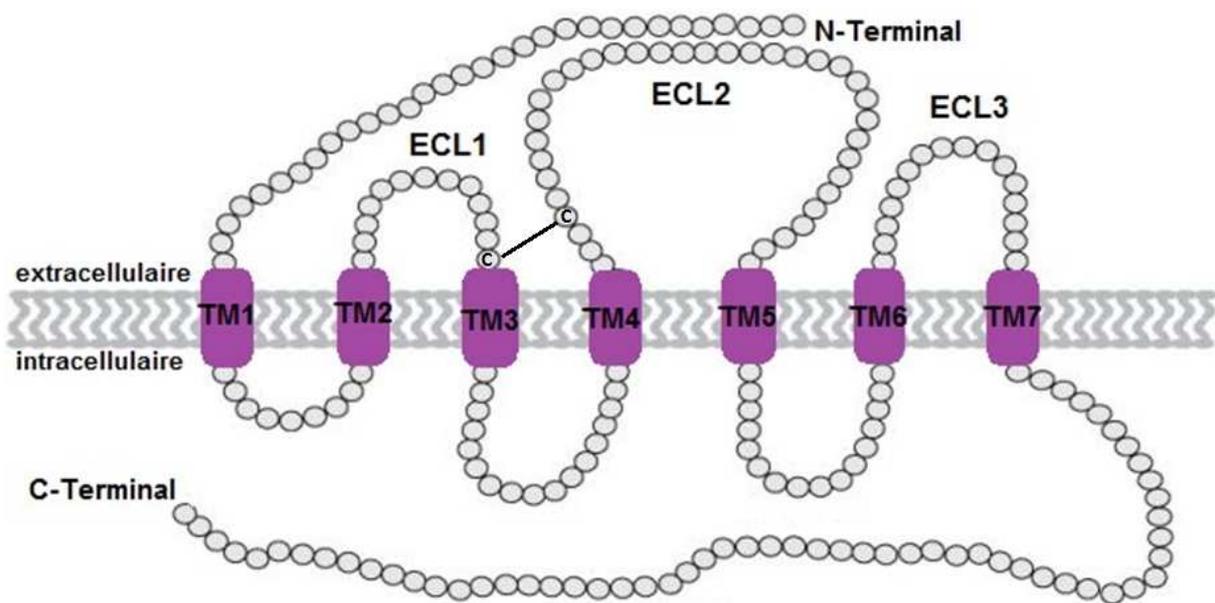


Figure 11 : Topologie typique d'un récepteur à chimiokine.

Les séquences en acides aminés étant différentes d'un récepteur à l'autre, ces derniers ont été schématisés par des cercles gris. Les parties violettes correspondent aux acides aminés transmembranaires.

Toutefois, certaines chimiokines, comme MCP-3 et I-309, ne montrant pas de tendance à s'oligomériser seule en solution, sont capable d'induire la migration cellulaire [227]. Ainsi, même s'il est utile de tenter de définir des mécanismes généraux, chaque chimiokine peut avoir son propre ensemble de propriétés. Par exemple, bien que la chimiokine RANTES exige l'oligomérisation pour l'activation des lymphocytes T, le monomère IL-8 est capable d'induire l'activation des neutrophiles [228].

De nombreuses études sont donc nécessaires pour bien comprendre les conséquences fonctionnelles de ces différentes formes de chimiokines. Cependant, il existe un autre niveau de complexité. En effet, en plus de leur capacité à l'homo-oligomérisation, certaines chimiokines peuvent également former des hétéro-oligomères. Nous pouvons citer l'hétéro-oligomérisation entre les chimiokines PF4 et RANTES, qui a été montré comme améliorant l'immobilisation *in vivo* des leucocytes sur les cellules endothéliales par rapport à la chimiokine RANTES seule [229].

I.B.3.1.3 Récepteurs des chimiokines et mécanismes de liaison

Les récepteurs de chimiokines sont intégrés dans la bicouche lipidique et possèdent sept domaines transmembranaires (TM 1 à 7) (Figure 11). Ces récepteurs ont été nommés CXCR1 à 6, CCR1 à 11, XCR1 et CX3CR1 selon qu'ils lient les chimiokines CXC, CC, C ou CX3C respectivement [230].

Les chimiokines d'une même famille se lient à un récepteur de la même famille [231] et une chimiokine peut lier plusieurs récepteurs. Il existe cependant quelques exceptions, à savoir que les récepteurs CXCR4, CXCR5, CXCR6, CCR6, CCR9, CX3CR1 et XCR1 (Figure 12) ne lient qu'une seule chimiokine.

Des expériences de mutagenèse sur les récepteurs de chimiokines ont permis d'identifier des régions spécifiques interagissant avec les antagonistes. Des mutations des récepteurs de chimiokines indiquent que les sites de liaison sont répartis dans toute la séquence. Vraisemblablement, ces résidus sont à proximité dans le récepteur sous sa forme active transmembranaire.

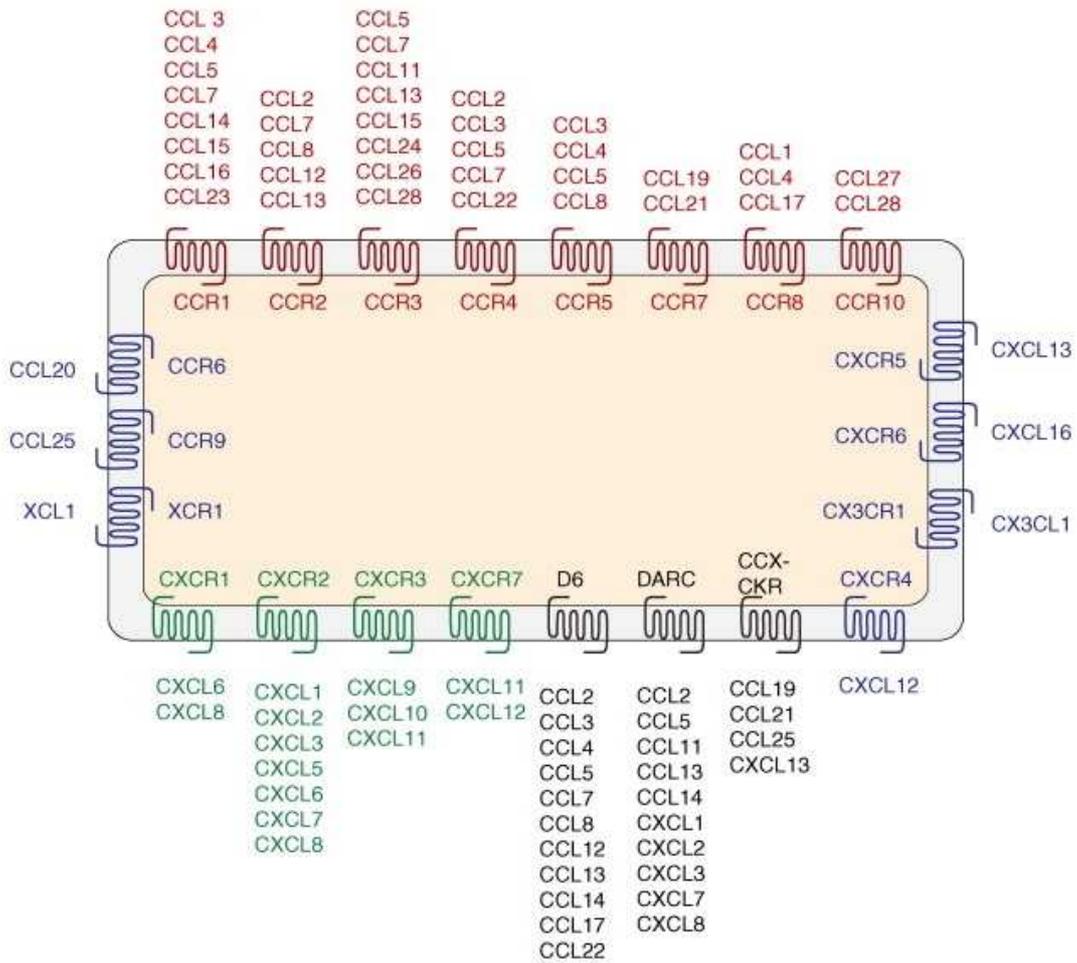


Figure 12 : Les récepteurs couplés aux protéines G et leur(s) chimiokine(s) associée(s).

Les récepteurs sont représentés par leur 7 domaines transmembranaires [232].

Le récepteur CXCR1 a un site de liaison au niveau de l'Asp 11. Lorsque ce résidu est remplacé par la glutamine ou lysine (résidus correspondant à CXCR2), la liaison à IL-8 n'est pas affectée. Toutefois, la substitution par une alanine provoque la perte de la liaison. Selon ces études, les résidus Glu 7, Asp 9 et Glu 12 sont également importants pour la liaison et l'activation, tandis que les résidus Lys 108, Asn 110 et Lys 120 ont été identifiés comme étant critiques pour la signalisation [233]. La partie N-terminale de CCR5 est également importante pour la reconnaissance et la liaison de ses agonistes. Le clivage de la région N-terminale diminue l'affinité des agonistes RANTES et MIP-1 β . Les résidus Asp 2, Tyr 3, Tyr 10, Asp 11, Glu 18 et Lys 26 du récepteur sont particulièrement importants pour la liaison [234-236].

Chaque récepteur possède un pont disulfure reliant les deux premières boucles extracellulaires (Figure 11). Il est essentiel pour la liaison de MIP-1 β . Il est intéressant de noter que l'absence de cystéines réduit, mais n'élimine pas, la liaison au récepteur CCR5 des souches VIH-1 R5 qui infectent les cellules par le biais de ce récepteur [237]. Il y a d'autres régions du récepteur CCR5 impliquées dans les interactions agonistes, comme la boucle ECL2, qui est importante pour une bonne signalisation [238]. En outre, les second et septième domaines transmembranaires jouent un rôle à la fois dans la fixation et/ou dans la signalisation. Le second domaine transmembranaire comprend un motif Thr-X-Pro (résidus 82-84). Ce motif introduit un coude dans le domaine hélicoïdal, probablement dû à la déstabilisation de l'hélice α par la proline.

Des modifications post-traductionnelles de récepteurs à chimiokines ont été observées comme affectant l'activité. La sulfatation des tyrosines, en particulier Tyr 3 dans la partie N-terminale de CCR5 est essentielle pour l'activité propre du récepteur, en se liant à des chimiokines. Le récepteur CXCR4 est lui modifié par une N-glycosylation des résidus Asn 11 et Asn 176. Ces modifications semblent permettre une forte affinité avec l'agoniste [239]. Le récepteur CCR2B possède lui à la fois des sites de glycosylation et de sulfatation (Tyr 26).

La structure tridimensionnelle d'un complexe chimiokine-récepteur n'a pas encore été déterminée, mais des épitopes structuraux indiquant l'activité de la famille des chimiokines ont été proposés par des études structurales et de mutagenèse.

L'extrémité N-terminale de toutes les chimiokines étudiées à ce jour est considérée comme activant le récepteur à la suite de reconnaissances et de liaison à ce dernier. Pour certaines chimiokines, par exemple, SDF-1 α et RANTES, le premier résidu de la partie N-terminale est essentiel pour l'activité. Pour SDF-1 α , le clivage de la lysine N-terminale provoque une perte totale de l'activité, formant ainsi un antagoniste puissant [165]. Pour

RANTES, si la sérine N-terminale est précédée d'une méthionine [240], ou est modifiée chimiquement (AOP-RANTES) [241], les molécules qui en résultent sont aussi des antagonistes puissants. C'est aussi le cas lorsque les deux résidus N-terminaux de l'éotaxine-1 et RANTES sont clivés par la dipeptidase CD26 à la surface des cellules [242, 243]. Dans la séquence de nombreuses chimiokines qui induisent l'activation et la migration des neutrophiles, un motif de trois résidus, Glu-Leu-Arg (motif ELR) dans l'extrémité N-terminale précédant la première cystéine est essentiel pour l'activité [157]. De même, pour la liaison CCR2-MCP-1, les dix résidus N-terminaux précédant la première cystéine sont impliqués dans la liaison au récepteur et dans l'activation. Une délétion du glutamate N-terminal provoque une réduction de l'activité, et une délétion des deux premiers résidus provoque la conversion d'un agoniste en antagoniste [244, 245]. L'absence des premiers résidus N-terminaux de MCP-1 conduit à une protéine mutante qui acquiert une nouvelle activité face aux éosinophiles. Ces cellules répondent au chimiotactisme après la mutation, mobilisent le Ca^{2+} cytosolique libre, et induisent la polymérisation de l'actine, probablement grâce à CCR3 [246]. Une exception à cette forte dépendance de la séquence N-terminale est la chimiokine ENA-78, qui est un puissant stimulateur de neutrophiles et est membre de la sous-famille CXC ELR+ (résidus 11 à 13 pour ENA-78).

La boucle N-terminale, qui suit les deux premières cystéines et relie l'extrémité N-terminale au simple brin de l'hélice 3_{10} (Figure 8), possède une séquence spécifique permettant la liaison principale au récepteur. Pour IL-8 les résidus YSKPF (résidus 13-17) confèrent une meilleure spécificité envers CXCR1 que CXCR2 [247-249]. Pour la chimiokine GRO- α , les résidus LQGI (résidus 15-18) confèrent une spécificité seulement pour CXCR2. Pour SDF-1 α , la séquence RFFESH (résidus 12-17) confère une spécificité pour le récepteur CXCR4. Une molécule chimérique obtenue par le remplacement de la partie N-terminale et de la boucle N dans GRO- α par la séquence N-terminale de SDF-1 α provoque un antagoniste de CXCR4 avec une activité sept fois moins importante que pour la forme sauvage de SDF-1 α [165].

Le coude de type I ou III reliant la première et la deuxième chaîne bêta est également impliqué dans la liaison au récepteur. Par exemple, dans MCP-1, les résidus Ser 34 et Lys 35 sont critiques pour l'activité [250, 251]. Parce que les chimiokines, à quelques exceptions près, ont des résidus chargés positivement dans cette position, il est possible que la boucle 30s soit impliquée dans une interaction électrostatique avec le récepteur apportant l'agoniste à la surface de la cellule. D'autres résidus, par exemple ceux sur la boucle N, déterminent sans doute la spécificité pour le récepteur.

Après la boucle 30s dans la séquence des chimiokines, le deuxième feuillet β , possède aussi un nombre significatif de résidus cationiques. Dans la plupart des chimiokines CXC et CC, l'extrémité C-terminale du second feuillet β porte une lysine ou une arginine. Cette région est supposée être le site de liaison des glycosaminoglycanes [195, 252-254]. L'implication ou non du troisième feuillet β des chimiokines n'est pas encore bien connu. L'hélice α C-terminale a été montrée comme modulant l'activité d'au moins trois chimiokines, MCP-1 [244], GRO- α [255], SDF-1 α [256], mais en général elle ne semble pas être impliquée dans l'activation du récepteur.

I.B.3.2 L'interaction des chimiokines et des GAGs

Les interactions entre les chimiokines et leur récepteur sont normalement considérées comme étant de stœchiométrie 1/1. Telles que mentionnées précédemment, les chimiokines interagissent également avec d'autres molécules pouvant affecter leur état oligomérique et/ou leur activité vis-à-vis du récepteur. En plus de leurs interactions avec les récepteurs, certaines, sinon toutes les chimiokines ont des interactions avec les GAGs. Ces interactions étaient initialement interprétées comme un mécanisme localisant et présentant les chimiokines à la surface des cellules avec des gradients haptotactiques guidant la migration des cellules, et empêchant la diffusion des chimiokines, en particulier dans les conditions de la circulation sanguine [52, 80, 216]. D'autres processus peuvent également impliquer des interactions avec les GAGs comme la transcytose de chimiokines à travers les cellules, la protection contre la protéolyse, des fonctions de co-récepteurs et de signalisation [24, 257, 258].

Les chimiokines sont des protéines très basiques (pI 9-10), tandis que les GAGs, tels que HP et HS, ont une forte densité de charges négatives provenant des groupements carboxylate et sulfate. Les interactions entre les chimiokines et les GAGs ont pu être démontrées *in vitro* [100, 216, 259]. Toutefois, afin de prouver que l'interaction avec les GAGs est fonctionnellement pertinente, des mutants des chimiokines MCP-1, MIP-1 β et RANTES ont été conçus pour ne pas lier HP, mais pour maintenir leur capacité à lier les récepteurs et à induire la migration des cellules *in vitro* [217, 260]. Ces mutants ont ensuite été testés *in vivo* dans des essais de recrutement par voie intrapéritonéale. Ces mutants n'ont pas été en mesure d'induire la migration [227]. Des mutants déficients pour la liaison aux GAGs d'autres chimiokines telles que MCP-3 et SDF-1 ont également été montrés comme fonctionnels *in vitro*, mais non fonctionnels *in vivo* [261, 262]. Ces études établissent clairement l'importance des GAGs dans la fonction des chimiokines.

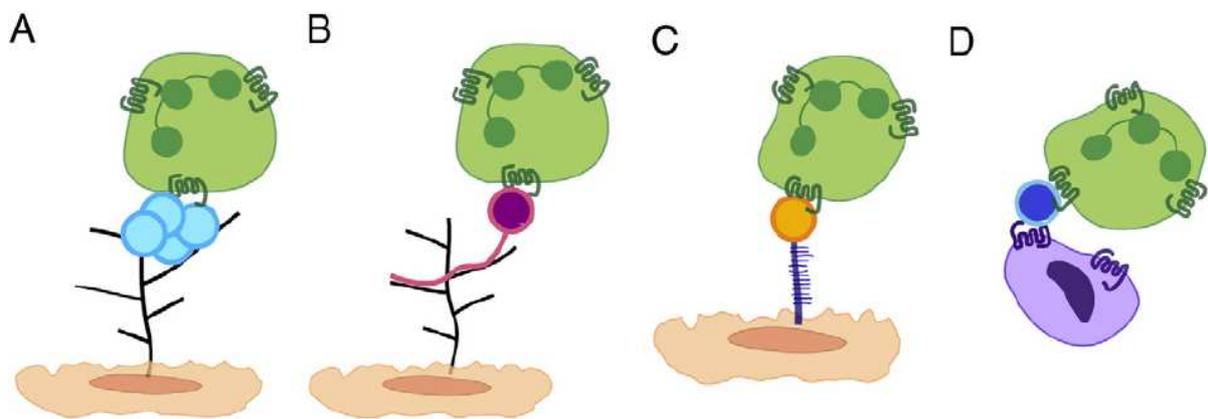


Figure 13 : Différents mécanismes pour la présentation des chimiokines sur des GAGs aux récepteurs des leucocytes.

Il faut noter qu'on ne sait pas si les chimiokines interagissent simultanément avec les GAGs et les récepteurs comme il est suggéré dans la figure, ou si elles sont distinctes. (A) Présentation de chimiokines (bleu clair) oligomérisées sur des PGs. (B) Certaines chimiokines, comme SDF-1 γ (violet), ont une longue partie C-terminale non structurée qui peut être utilisée comme un « hameçon ». (C) Certains récepteurs peuvent agir comme molécules de présentation, CCRL2 est un exemple) [263]. (D) En plus de fournir un mécanisme de présentation, certaines chimiokines (bleu foncé) agissent directement en tant que molécules d'adhésion, comme c'est le cas pour la fractalkine et CXCL16 [264]. D'après [221].

Les mécanismes d'interaction avec les GAGs demeurent mal connus. Dans la plupart des études visant à définir les sites des chimiokines impliquées dans la liaison aux GAGs, les résidus basiques dans des motifs de séquence linéaire comme BBXB (où B est un résidu basique) ont été mutés, et les effets des mutations sur la liaison à HP *in vitro* ont été évalués. Ces études ont révélé une grande diversité topologique dans l'emplacement des sites de liaison : l'hélice C-terminale dans IL-8, la boucle 40s dans MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES, la boucle 20s dans SDF-1, et le cluster de 50s dans I-TAC [186, 265]. Toutefois, il a également été montré que les chimiokines sont nombreuses à s'oligomériser en présence de GAGs, suggérant que les épitopes de liaison peuvent sensiblement être plus grands et plus distribués dans le cadre des dimères et des structures oligomériques d'ordre supérieur que pour les monomères. MCP-1, qui est dimérique en solution, pourrait former des tetramères en présence de GAGs [217].

Ces données ont conduit à l'hypothèse que les GAGs promeuvent l'oligomérisation des chimiokines fournissant ainsi une plus vaste surface de liaison, ce qui peut être important pour la présentation à la surface cellulaire en particulier sous écoulement. De façon plus spéculative, il a été suggéré que les différents types de GAGs, étant extrêmement hétérogènes, pourraient induire des structures tridimensionnelles de chimiokines différentes, ce qui pourrait contribuer à la spécificité de la migration cellulaire [52]. L'oligomérisation peut également être nécessaire pour les chimiokines se liant simultanément à un récepteur et à un GAG, comme c'est le cas pour de nombreuses oligomérisations de chimiokines. Bien sûr, cette hypothèse suppose que les interactions avec le récepteur et le GAG soient simultanées comme illustré dans la Figure 13, ce qui actuellement n'est pas prouvé.

Toutefois, l'oligomérisation en présence de GAGs n'est pas le seul mécanisme pour la présentation des chimiokines aux récepteurs (Figure 13). Certaines chimiokines ont de longues parties terminales désordonnées. Dans le cas de SDF-1 γ , une isoforme de SDF-1 α , la chimiokine possède une partie C-terminale d'environ 30 résidus basiques, suggérant un éventuel rôle dans la liaison aux GAGs [266, 267] (I.B.3.4.1). Comme un domaine non structuré peut potentiellement se replier dans des conformations différentes pour tenir compte de nombreux partenaires oligosaccharidiques, celui-ci pourrait intervenir dans la reconnaissance des GAGs. Peut-être l'exemple le plus impressionnant de la « plasticité » structurale dans la liaison des GAGs concerne la lymphotactine. La chimiokine peut adopter deux conformations complètement différentes : une structure canonique se liant au récepteur, ou un dimère formant un sandwich- β se liant aux GAGs [213]. Ce scénario oppose l'oligomérisation de certaines chimiokines où les sites de liaison du récepteur et des GAGs se chevauchent souvent, avec des chimiokines comme SDF-1 γ où ils peuvent être indépendants.

En résumé, les chimiokines peuvent reconnaître différents GAGs, non seulement par la liaison d'épitopes dans le cadre de structures tertiaires, mais aussi par des changements dans le niveau d'oligomérisation, des changements dans le repliement des domaines non structurés, et également des changements de conformation. Un défi pour l'avenir sera de déterminer toutes les structures des complexes chimiokines-GAGs, ainsi que la spécificité et la diversité de ces structures et leurs rôles précis dans la biologie des chimiokines. Il reste la difficulté à travailler avec les GAGs qui sont hétérogènes et difficiles à synthétiser. Cependant de nouvelles technologies en glycobiologie font progressivement lever ces barrières.

I.B.3.3 Intérêt thérapeutique des chimiokines

La biologie des chimiokines est encore un nouveau domaine de l'immunologie, avec les premiers récepteurs identifiés depuis seulement une décennie. Les récepteurs sont une cible intéressante pour de petites molécules inhibitrices du système immunitaire. Cependant, à l'heure actuelle ces molécules antagonistes ne sont pas disponibles pour la grande majorité des récepteurs, ou bien ne sont pas encore autorisées. De plus, de nombreuses questions se posent quant au choix de(s) la(es) cible(s). C'est pourquoi de nombreux efforts sont faits pour découvrir et synthétiser ces molécules, et le nombre de brevets résultant de ces travaux est en constante augmentation.

Il est intéressant d'examiner le nombre de brevets publiés pour les récepteurs individuels. Par exemple, le grand nombre de brevets pour les petites molécules inhibitrices de CCR3 reflète l'intérêt de l'industrie pharmaceutique dans un nouveau traitement contre l'asthme, sans doute l'un des plus grands marchés du monde occidental. L'identification des récepteurs de chimiokines en tant que co-récepteurs du VIH a un effet important sur les programmes de dépistage, et est satisfaisante comme en témoigne le nombre croissant de molécules brevetées ciblant le récepteur CCR5. Toutefois, le nombre de petites molécules brevetées pour l'autre co-récepteur du VIH (CXCR4) est décevant, en particulier compte tenu de son implication dans les métastases du cancer.

Il est maintenant clair que certaines chimiokines se lient à plusieurs récepteurs, ce qui soulève une question, à savoir quels ligands devraient être ciblés pour le dépistage [268]. Une des premières molécules décrite dans la littérature est un inhibiteur de CCR5, TAK779 [269]. La cartographie de son site de liaison, sur un panel de mutants de CCR5, a montré qu'il est en fait un inhibiteur non-compétitif, car il se lie à une cavité, formée entre les hélices

transmembranaires 1, 2, 3 et 7, et non aux domaines extracellulaires qui forment les sites de liaison du ligand [270].

Les autres questions qui se posent souvent sont de savoir si un inhibiteur doit être spécifique ou si l'inhibition de plusieurs récepteurs de chimiokines serait avantageuse. Le composé BX471 (Berlex Inc.) a été montré comme extrêmement sélectif de CCR1, alors que l'inhibiteur TAK779 de CCR5 est également actif sur CCR2, qui est le récepteur ayant la plus forte homologie avec CCR5 [269]. D'autres inhibiteurs ont également été reportés comme inhibant à la fois CCR1 et CCR3 [271]. Comme ces deux récepteurs sont exprimés sur les éosinophiles, cette sélectivité pourrait être avantageuse pour le développement d'une thérapie contre l'asthme. Une molécule active a également été identifiée dans l'inhibition de la liaison à CCR1, CCR3, CCR5 et CXCR4, mais n'affecte pas CCR2 ou CXCR2 [272].

L'un des principaux obstacles rencontrés dans le développement de molécules antagonistes des récepteurs est la réactivité croisée différente entre les espèces, ce qui crée des problèmes pour les essais sur des modèles animaux, comme on l'a constaté avec BX471 [273]. Par conséquent, bien que le nombre de molécules antagonistes du récepteur soit en pleine expansion, nous manquons encore de données sur des modèles de maladies animales. Ces données pourraient être obtenues à partir de modèles primates, représentant une dépense considérable, mais bien réalisées, ces études de toxicité devraient permettre des tests rapides chez les humains. Il a été révélé publiquement que certains programmes de petites molécules, y compris pour les récepteurs CXCR2, CXCR4, CCR1 et CCR5 sont entrés dans la phase I des essais cliniques, mais aucune donnée n'a encore été publiée.

I.B.3.4 Choix des cytokines et des chimiokines comme modèles d'études

Comme nous venons de le voir tout au long de ce chapitre, les cytokines et les chimiokines interviennent dans de nombreux processus biologiques. Nombre de ces processus sont liés à l'interaction de ces dernières avec les glycosaminoglycanes. De plus, leur potentiel thérapeutique les rend importantes, puisque de réelles applications sont attendues.

Les chimiokines sont de petites protéines, par conséquent leur étude est plus facile que pour d'autres cytokines. Que l'on aborde le sujet d'un point de vue biologique, ou bien biochimique, la finalité reste la même : comprendre le rôle fondamental de ces interactions protéines/GAG. Cette compréhension permettra sans doute de trouver le moyen de contrer les processus pathologiques, tout en n'interférant pas sur les processus physiologiques. Contrer ces processus reviendrait à trouver le moyen d'empêcher la fixation de la protéine sur son récepteur *via* l'intervention d'une molécule synthétique. La cible de la molécule pourrait être la protéine, en empêchant sa fixation sur le récepteur, ou directement le récepteur, en empêchant la fixation de la protéine. On sait que les chimiokines interagissent avec les GAGs lors des processus biologiques. Notre choix s'est donc tourné vers l'étude des interactions chimiokines/GAGs, car un GAG synthétique pourrait cibler les chimiokines. Ce choix a été fait en fonction de la technique d'analyse utilisée. Le couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse permet en effet, d'apporter de nombreuses informations sur ces interactions.

Au cours de ce travail, les interactions de certains GAGs avec trois protéines ont été étudiées : SDF-1 α , MCP-1 et l'IFN γ . Les sous parties qui suivent décrivent plus précisément ces trois protéines.

I.B.3.4.1 La chimiokine SDF-1 α

La chimiokine Stromal cell-Derived Factor-1 (SDF-1 ou CXCL12), appartenant à la famille des chimiokines CXC, est exprimée et sécrétée dans les tissus des vertébrés de façon constitutive et ubiquitaire. Le gène codant pour SDF-1, initialement cloné par Tashiro *et al.* en 1993 [274], est localisé sur le chromosome 10 (localisation 10q11.1) [275]. Ce gène, hautement conservé chez les vertébrés, fut par la suite identifié comme facteur stimulant la prolifération des cellules B précurseurs (PBSF : Pre-B cell growth Stimulating Factor) par Nagasawa *et al.* en 1996 [276]. Contrairement à SDF-1, les autres chimiokines de la famille CXC sont codées par des gènes localisés sur le chromosome 4 et les gènes des chimiokines CC sont localisés sur le chromosome 17 [157].

Oligomérisation de la chimiokine SDF-1

SDF-1 possède une structure typique des chimiokines stabilisée par deux ponts disulfure. Elle se compose d'une extrémité N-terminale structurée de 10 résidus, suivis d'une longue boucle, une hélice 3_{10} , feuillets β et une hélice α C-terminale. La chimiokine SDF-1 adopte une structure tertiaire conservée et ses formes fonctionnelles sont connues : monomérique ou dimérique.

La structure quaternaire de SDF-1 a été décrite comme monomérique à pH 4,9 d'après des études par RMN [165]. Deux structures dimériques cristallines ont été obtenues en présence de 1,6 ou 1,9 M de sulfate d'ammonium à pH 7 et pH 8 [192, 277]. Une étude par ultracentrifugation analytique dans un tampon phosphate à pH 7,4 révèle un équilibre monomère-dimère [278]. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les conditions en solution peuvent affecter l'état d'oligomérisation de SDF-1, de manière comparable aux propriétés d'agrégation et de conformation dépendantes du pH et des sels observées pour les autres chimiokines [211, 218, 279, 280]. En effet, Veldkamp et ses collègues [128] ont montré que SDF-1 existe sous la forme d'un équilibre monomère-dimère uniquement sous certaines conditions : le pH acide favorise l'état monomérique en déstabilisant la structure dimérique, tandis que le pH physiologique et les anions, incluant le phosphate, sulfate et citrate, déplacent l'équilibre vers le dimère.

L'influence des GAGs sur cet équilibre a également été prouvée en utilisant un disaccharide d'HP. Les données obtenues [128] suggèrent que, à pH physiologique, HP favorise aussi la dimérisation de SDF-1. Cet équilibre monomère-dimère a été caractérisé par ultracentrifugation analytique et diffusion de la lumière dynamique, avec un K_d de $150 \pm 30 \mu\text{M}$ à pH 7,4 dans un tampon phosphate [278], et est en accord avec le K_d de $140 \pm 19 \mu\text{M}$ déterminé par polarisation de fluorescence [128]. Pour que la dimérisation de SDF-1 se produise, des anions (phosphate, sulfate, citrate ou HP) doivent être présents et le pH doit être au-dessus du pK_a du résidu His 25 ($\text{pH} > 6$), qui est positionné à l'interface du dimère.

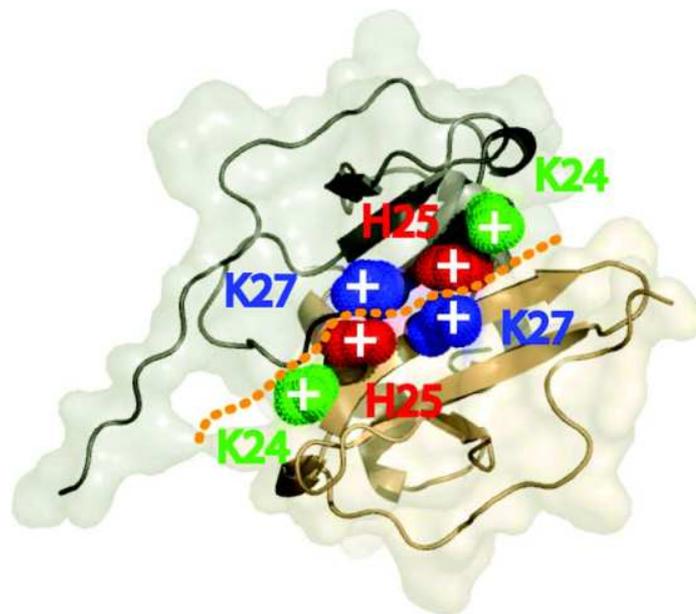


Figure 14 : Perturbations électrostatiques et stabilisation du dimère SDF-1.

Structure cristalline avec les résidus basiques mis en évidence. Les chaînes latérales de K24 (vert), H25 (rouge), et K27 (bleu) sont représentées [128].

Ce résidu est en interaction avec la chaîne latérale positivement chargée de la Lys 27 de la sous-unité opposée (Figure 14). Cette hypothèse a été vérifiée, en remplaçant le résidu His 25 par une sérine ou un autre acide aminé. Cette mutation avait pour effet d'éliminer l'effet du pH sur la dimérisation. A faible pH, la protonation de la chaîne latérale du résidu His 25 crée une paire d'ions défavorable (répulsion électrostatique) à l'interface du dimère.

L'augmentation de la charge positive, quand le pH est inférieur au pKa du résidu His 25, est supposée conduire à des répulsions électrostatiques entre les deux sous-unités, perturbant ainsi le dimère de SDF-1. Une comparaison avec les autres chimiokines CXC révèle que le résidu histidine est présent uniquement dans la chimiokine SDF-1, à cette position.

Isoformes de SDF-1

Le gène codant SDF-1 subit un épissage alternatif donnant lieu à différentes isoformes de la protéine [281]. Jusqu'à récemment, deux isoformes avaient été décrites [281]. La forme prédominante, SDF-1 α , code pour une protéine de 68 résidus (7958,3 Da ; pI 9,9), tandis que l'isoforme SDF-1 β contient quatre acides aminés en plus à l'extrémité C-terminale [282]. Cette isoforme β stimule notamment l'angiogenèse et elle est localisée dans des organes très vascularisés comme le foie, la rate ou encore les reins [283]. L'isoforme α humaine présente une homologie d'environ 95% avec les isoformes provenant des souris. Concernant les autres chimiokines, le taux d'homologie se situe aux alentours de 70%, ce qui suggère un rôle fondamental de la chimiokine SDF-1 dans les processus physiologiques [165].

De nombreuses données fonctionnelles sur SDF-1 ont été obtenues à partir de SDF-1 α et β , bien qu'à ce jour, trois isoformes (α , β et γ) et six isoformes (α , β , γ , δ , ϵ et ϕ) de SDF-1 aient été découvertes respectivement chez les rongeurs [284] et les humains [282]. Toutes ces isoformes partagent les trois mêmes premiers exons correspondant à l'isoforme α (résidus 1-68), mais diffèrent dans leur quatrième exon, ce qui leur confère un domaine C-terminal spécifique [282, 285].

Processus de dégradation

SDF-1 est exprimée de façon ubiquitaire et constitutive dans les tissus des vertébrés. Les vertébrés ont développé une méthode de préservation de SDF-1 *via* la régulation du processus de dégradation [286]. SDF-1 est protéolytiquement dégradée aux deux

extrémités. La protéolyse de la partie N-terminale s'opère lentement et est indépendante des isoformes et se produit à la fois dans le sang et les tissus. Cela bloque l'activité de la chimiokine et abaisse l'affinité de SDF-1 pour son récepteur. Inversement, la dégradation du C-terminal est rapide, dépend de l'isoforme et se produit seulement dans le sang. La dégradation est médiée par une N-carboxypeptidase (CPN), qui est une enzyme également impliquée dans la dégradation d'autres protéines [287]. La protéolyse de la partie C-terminale n'inactive pas SDF-1, mais diminue son activité de moitié, atténuant la stabilisation des chimiokines en interaction avec les GAGs au niveau de la surface cellulaire.

Cependant, seule SDF-1 α , qui est l'isoforme prédominante et la plus petite, est sensible à ce processus. C'est pourquoi les vertébrés ont développé un mécanisme de régulation supplémentaire de la partie C-terminale de la forme prédominante. Ce mécanisme peut empêcher un déséquilibre homéostatique résultant d'une libération soudaine de SDF-1, provenant des tissus, dans le sang. La présence d'un quatrième exon durant l'épissage prévient donc la dégradation protéolytique de la partie C-terminale des chimiokines dans le sang. Ainsi, SDF-1 β , qui est relativement identique à SDF-1 α excepté la présence du quatrième exon, montre une activité très similaire *in vitro* et dans les tissus, mais est deux fois plus importante dans le sang.

Interaction de SDF-1 avec les GAGs

Bien entendu, les informations biologiques nécessaires au système des chimiokines ne sont pas seulement stockées dans la séquence des protéines impliquées, mais également dans la structure des GAGs, en particulier HS auquel se lient la plupart des chimiokines [288] principalement à travers des interactions ioniques.

En dehors de la sensibilité de la partie C-terminale à la protéolyse, un autre mécanisme régulateur de l'activité de SDF-1 a été observé. Il a été montré que la liaison aux GAGs est nécessaire pour l'accumulation des leucocytes [289], et qu'elle empêche l'attaque protéolytique, allongeant la durée de vie des molécules de SDF-1 [266]. Par conséquent, l'affinité de la liaison aux GAGs, qui varie selon les isoformes de SDF-1, fournit un autre mécanisme de régulation spécifique pour le couple SDF-1/CXCR4.

L'interaction de SDF-1 α avec les GAGs est essentiellement représentée par un motif de liaison à HS, BBXB (B pour résidu basique), localisé dans le premier feuillet β de la protéine [290]. La liaison de SDF-1 α à HS implique les résidus critiques K24 et K27, qui avec R41 forment la partie essentielle du site de liaison de [254, 291] et sont distincts de ceux requis pour la liaison au récepteur CXCR4.

Etant donné que les isoformes δ , ϵ et ϕ ne possèdent pas de motifs de liaison à HS reconnaissable dans leur partie C-terminale, nous pouvons supposer que, comme SDF-1 α , les résidus K24-K27-R41 des isoformes définissent leur capacité à interagir avec ce GAG. La situation est radicalement différente pour l'isoforme SDF-1 γ . En effet, cette isoforme de SDF-1 possède une extrémité C-terminale de 30 résidus, remarquablement conservée entre les rongeurs et les humains (Figure 15). Comme montré par RMN, ce peptide carboxy-terminal (résidus 69-98) est caractérisé par une grande flexibilité et est désordonné en solution, alors que les 68 premiers résidus de SDF-1 γ ont une structure très similaire à celle de SDF-1 α . La partie C-terminale est composée de 18 résidus basiques (B), neuf d'entre eux étant regroupés dans trois domaines BBXB liant HS. L'existence de motifs de liaison à HS carboxy-terminaux suggère que SDF-1 γ pourrait interagir avec une affinité renforcée et/ou une sélectivité différente avec les GAGs pour accomplir des fonctions spécifiques. En effet, le quatrième exon de l'isoforme SDF-1 γ , lui procure la plus grande affinité (Tableau 7) pour les GAGs, jamais observée pour les chimiokines [267].

Ainsi, SDF-1 γ se lie à la surface cellulaire immédiatement après la sécrétion et l'isoforme n'est pratiquement jamais trouvée sous une forme libre. Bien que cette isoforme soit moins puissante qu'un agoniste, elle est plus efficace en particulier sur une période plus longue, grâce à la persistance de ses interactions. Une administration intrapéritonéale de SF1- α et SDF-1 γ produit pratiquement la même réponse locale inflammatoire après 3 heures, mais après 16 heures, la réaction inflammatoire est présente seulement dans les animaux inoculés avec SDF-1 γ . Les isoformes SDF-1 δ , SDF-1 ϵ et SDF-1 ϕ ont récemment été mises en évidence, mais aucun mécanisme spécifique de régulation n'a encore été attribué à ce jour [282]. La forme γ est caractérisée par une surface de liaison aux GAGs étendue, lui conférant une forte affinité pour HS et le dermatane sulfate.

Interaction de SDF-1 avec son récepteur CXCR4

L'activité de la chimiokine SDF-1 réside majoritairement dans sa région N-terminale. En effet, cette région permet la reconnaissance et la liaison de la chimiokine au niveau de son récepteur CXCR4 dont elle est le seul ligand physiologique connu. Un modèle en deux étapes de l'interaction fut proposé par Crump *et al.* [165]. L'interaction s'initie *via* la séquence RFFESH (résidus 12-17) de SDF-1 et les résidus 2-36 du récepteur CXCR4 ce qui engendrerait un changement conformationnel du récepteur [292].

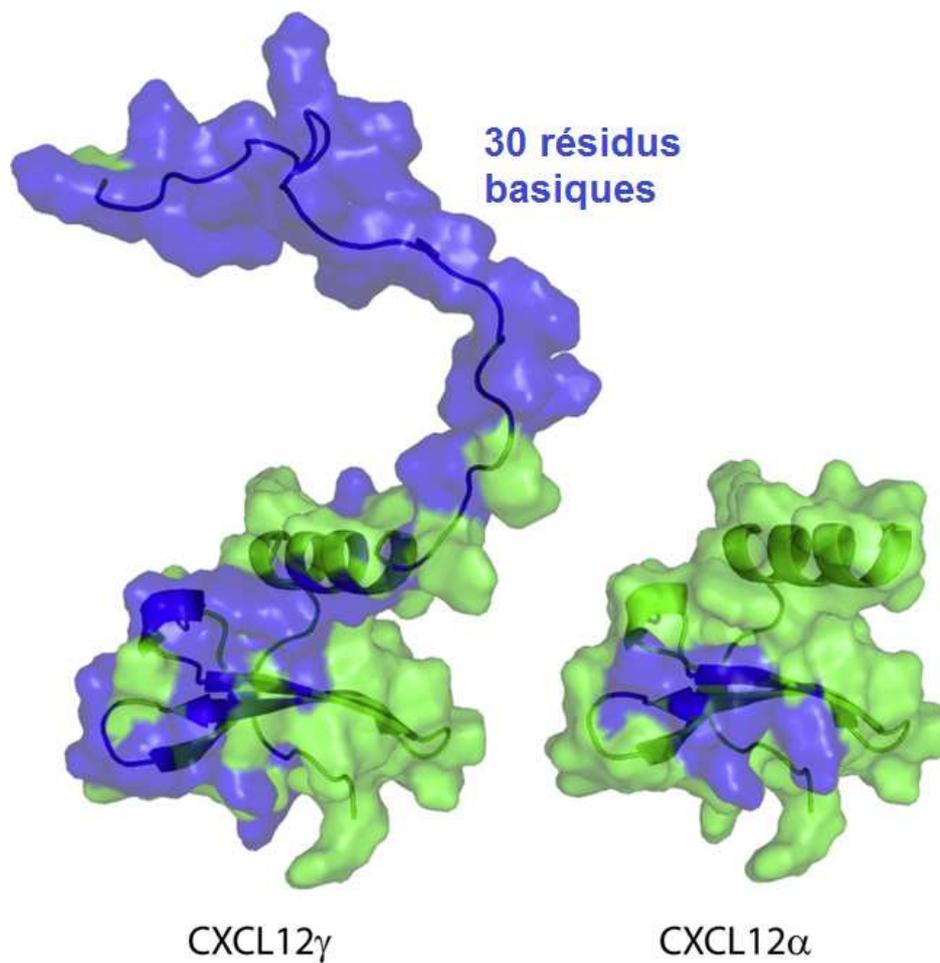


Figure 15 : Représentation des surfaces de liaison des GAGs (bleu) des isoformes α et γ de SDF-1.

[254, 267, 293]

	HP	HS	DS
SDF-1 α / CXCL12 α	93 \pm 6,1 nM	200 \pm 14 nM	Pas de liaison
SDF-1 β / CXCL12 β	24,7 \pm 2,6 nM	53 \pm 2,7 nM	Pas de liaison
SDF-1 γ / CXCL12 γ	0,91 \pm 0,07 nM	1,5 \pm 0,2 nM	4,8 \pm 0,04 nM

Tableau 7 : Constantes de dissociation (Kd) des isoformes α , β et γ de la chimiokine SDF-1.

Kd pour HP (HP), HS (HS) et le dermatane sulfate (DS) déterminées par résonance des plasmons de surface (SPR) [267].

Ce changement de conformation facilite l'interaction entre les huit premiers résidus de la chimiokine et un site de fixation alors exposé au niveau du récepteur impliquant les résidus présents dans les deuxième (Asp 187) et troisième (Glu 268) boucles extracellulaires [294].

On retrouve CXCR4 dans de nombreux types cellulaires : sur les cellules embryonnaires [295], sur les cellules inflammatoires (lymphocytes T et B, neutrophiles) [296, 297], sur les cellules endothéliales et épithéliales [298, 299], sur les cellules nerveuses du système nerveux central [300, 301] ainsi que sur les cellules cancéreuses [302]. Le récepteur prédominant de SDF-1, CXCR4, possède aussi une forme alternative due à l'épissage, CXCR4-Lo. CXCR4-Lo diffère du récepteur humain CXCR4 au niveau de la partie N-terminale mais aboutit en une protéine fonctionnelle qui se lie à SDF-1 et provoque une mobilisation du calcium intracellulaire et le chimiotactisme. Il a été suggéré que les récepteurs CXCR4 et CXCR4-Lo possèdent une affinité différente pour SDF-1 ou le virus du VIH [303].

Récemment, un récepteur alternatif pour SDF-1 a été décrit [304, 305]. Initialement décrit comme RDC1 en 1994 [306], CXCR7 révèle une grande affinité de liaison pour SDF-1 et I-TAC. Il est également couplé aux protéines G. Le récepteur CXCR7 est largement exprimé dans les cellules vasculaires et gliales mais ses fonctions ne sont pas encore connues [307, 308].

Fonctions physiologiques et pathologiques de SDF-1

Hématopoïèse et inflammation : L'équipe de Nagasawa en 1994 révéla le premier rôle de la chimiokine SDF-1. En effet, elle démontra que la chimiokine participait à la prolifération des lymphocytes B dans la moelle osseuse mais également dans le foie. De plus, il fut démontré que les animaux présentant une absence de SDF-1 présentaient une malformation cardiaque et ne survivaient pas [276]. SDF-1 joue également un rôle dans la maturation des thymocytes dans le thymus. Il faut cependant noter que SDF-1 n'est pas la seule cytokine à intervenir dans la maturation et la prolifération des lymphocytes B. C'est aussi le cas pour IL-7, BST-1, IGF-1, PBEF [309].

Embryogenèse : SDF-1 possède un rôle important dans le développement embryonnaire de plusieurs organes comme le développement des systèmes nerveux, cardiovasculaire et immunitaire [171, 310]. Une étude sur des embryons de souris âgés de 8 à 13 jours a révélé une forte abondance de SDF-1 et de son récepteur [311].

Chimiotactisme : SDF-1 intervient également dans les processus chimiotactiques en recrutant les lymphocytes, les neutrophiles et les monocytes/macrophages vers les sites d'inflammation [171, 297, 312]. Il a été démontré que SDF-1 peut induire la migration de cellules neuronales, endothéliales progénitrices [313-315] et hématopoïétiques souches [316].

Apoptose : SDF-1 a un rôle anti-apoptotique dans les cellules souches hématopoïétiques [317] et les cellules pancréatiques [318] en diminuant la dégradation de l'ADN et en augmentant l'expression d'une protéine anti-apoptotique, la B-cell lymphoma (bcl-2) [317]. Cependant, la protéine gp120 du VIH peut lier le récepteur CXCR4 et cette liaison induit l'apoptose des cellules T [319] et des cellules du cortex [320].

Angiogenèse : SDF-1 est impliquée dans l'angiogenèse au niveau des régions endommagées en participant à la migration de cellules endothéliales [321, 322] et en augmentant la présence de facteurs angiogéniques tel le VEGF [323]. SDF-1 est également connue pour participer à l'angiogenèse dans les tumeurs comme dans le cancer de la prostate [324], du rein [325], du pancréas [326], du poumon [327], des ovaires [328], du sein [329], du côlon [330] et du cerveau [302].

I.B.3.4.2 La chimiokine MCP-1

La chimiokine « Monocyte Chemoattractant protein 1 » (MCP-1 ou CCL2) est une protéine de 76 acides aminés (7698,0 Da ; pI 9,4) appartenant à la sous famille CC des chimiokines. MCP-1 est impliquée dans des processus mettant en jeu les récepteurs couplés aux protéines G [331-333] et les protéoglycanes de surface [52, 334]. MCP-1 gouverne le recrutement de plusieurs populations de leucocytes incluant les monocytes, les lymphocytes T et les cellules NK [335], en interagissant avec le récepteur à 7 domaines transmembranaires CCR2. Ainsi, MCP-1 est fortement impliquée dans une variété de maladies comme l'athérosclérose [336, 337], l'insuffisance cardiaque congestive [338, 339], la polyarthrite rhumatoïde [340-342], les maladies inflammatoires de l'intestin [343] ou du système nerveux central [344] et l'uvéite¹¹ [345-347]. MCP-1 se lie exclusivement au récepteur CCR2, contrairement à beaucoup d'autres chimiokines inflammatoires [348], mais CCR2 est également activé par plusieurs autres chimiokines, y compris MCP-2, MCP-3, MCP-4 chez l'homme et MCP-2 et MCP-5 chez la souris [158]. L'importance de ce couple

¹¹ Une uvéite est (chez l'Homme ou l'animal) une inflammation de l'uvée (iris, corps ciliaires et /ou choroïde).

chimiokine-récepteur dans des modèles de maladies inflammatoires chez la souris, y compris la sclérose en plaques, l'athérosclérose et l'uvéite, a été confirmée [345-347, 349-351].

Oligomérisation de MCP-1

MCP-1 se dimérise à de fortes concentrations du fait de sa constante de dissociation (Kd) de 570 μM déterminée par sédimentation [352]. Pourtant, effectuant également des expériences de sédimentation, Paolini *et al.* [353, 354] ont déterminé un Kd de $0,86 \pm 0,64$ μM . L'auteur conclue que la différence de valeurs est certainement due aux conditions utilisées pour l'analyse.

On retrouve une grande diversité de formes oligomériques des chimiokines. Les formes non oligomérisées peuvent avoir une activité thérapeutique comme l'a démontré une forme monomérique de MCP-1 possédant des propriétés anti-inflammatoires dans des modèles animaux de l'encéphalomyélite auto-immune et de l'arthrite [355, 356]. L'oligomérisation de MCP-1 est connue pour être nécessaire à son activité *in vivo* [227].

Une forme tronquée de MCP-1 (résidus 10-76) a été détectée comme monomérique à toutes les concentrations testées, suggérant que l'interaction du dimère natif de MCP-1 est localisée au niveau de l'extrémité N-terminale [352]. De la même manière, un mutant proline-alanine (P8A) de MCP-1 ne peut pas s'oligomériser [219], ce même à des concentrations millimolaires, contrairement à la forme sauvage qui se dimérise à des concentrations nanomolaires voire submicromolaires en fonction des conditions en solution. Les monomères P8A MCP-1 ne sont pas capables d'induire le recrutement cellulaire dans la cavité péritonéale de souris, en dépit de leur capacité à induire la migration cellulaire aussi efficacement que leurs homologues sauvages [355]. Le résidu proline en position 8 est donc essentiel à la dimérisation de MCP-1 [219].

Ces études ont clairement démontré l'incapacité des mutants de MCP-1 à induire la migration *in vivo* même s'ils possèdent une chimiotaxie robuste *in vitro*, indiquant que les oligomères de chimiokines ont un rôle fonctionnel.

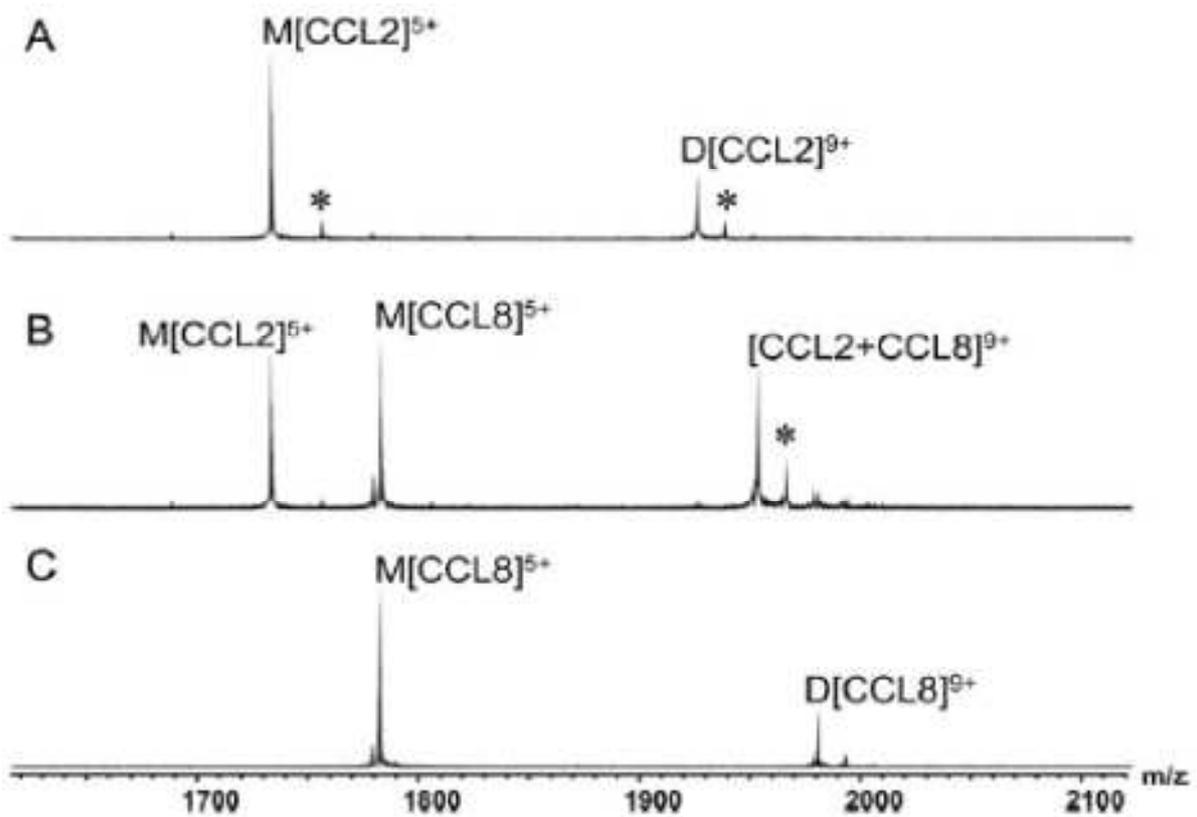


Figure 16 : Spectre de masse ESI-FTICR dans 100 mM NH_4OAc (pH 6,8).

(A) MCP-1 (CCL2) 10 μ M, (B) MCP-1 10 μ M + MCP-2 (CCL8) 10 μ M et (C) MCP-2 10 μ M. L'astérisque représente l'adduit acide trifluoroacétique. $M[CCL2]$ représente le monomère et $D[CCL2]$ représente le dimère [357].

Par spectrométrie de masse (nESI IMS-MS), Schenauer et ses collègues ont été en mesure d'établir que MCP-1 existait principalement sous la forme d'un équilibre monomère/dimère [358], ce qui est en accord avec les études d'ultracentrifugation analytique [217, 353, 359]. Cependant, il a été montré que le dimère de MCP-1 n'est pas particulièrement stable en phase gazeuse [358]. Des trimères et tetramères ont également été observés, cependant la spécificité de ces oligomères est discutable.

Interaction de MCP-1 avec son récepteur CCR2

Afin d'identifier les résidus de la chimiokine MCP-1 impliqués dans la liaison au récepteur CCR2, une substitution de tous les résidus exposés à la surface par des résidus alanine a été réalisée [360]. Des études ont également impliqué la mutation d'autres résidus afin de déterminer l'importance de la charge, l'hydrophobicité ou l'aromaticité à des positions spécifiques. Il en résulte que huit résidus N-terminaux sont importants pour la signalisation. On retrouve des résidus basiques (K18, K19, R25, K35, K38, et K49) et hydrophobes (Y13 et P37) [361]. Il existe des preuves provenant d'études par RMN que plusieurs résidus de MCP-1, particulièrement C11, F15, T16 et I51, établissent des contacts avec l'extrémité N-terminale du récepteur CCR2 [362, 363]. Les résultats obtenus par Monteclaro *et al.* suggèrent un modèle en deux étapes conduisant à l'activation du récepteur [362]. Dans la première étape, MCP-1 se lie avec une haute affinité au domaine N-terminal extracellulaire (acides aminés 1 à 40) du récepteur. La seconde étape est la formation d'une faible liaison entre MCP-1 et une ou plusieurs des boucles extracellulaires du récepteur. Elle sert à initier la transduction du signal.

Hétérodimérisation des ligands de CCR2

Crown *et al.* ont caractérisé l'hétérodimérisation des ligands de CCR2 : MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 et l'éotaxine, ainsi que les effets de la liaison des GAGs en utilisant un spectromètre de masse ESI-FTICR [357].

Pour étudier l'effet d'un GAG hautement sulfaté sur la formation d'hétérodimères, un mélange équimolaire de 2 chimiokines a été analysé par ESI-FTICR en présence du pentasaccharide d'HP Arixtra®. Les chimiokines MCP-1 et MCP-2 ont montré une forte propension à s'hétérodimériser (Figure 16), tandis que la formation des hétérodimères entre MCP-1 et l'éotaxine, MCP-1 et MCP-4, et MCP-2 et MCP-4 est beaucoup plus faible.

	Ligand	Kd	Méthode de détermination
MCP-1 (WT)	HP non fractionnée (Sigma)	1,55 µM	Fluorescence [217]
	[³ H] HP	1,5 µM	Spectrométrie à scintillation [364]
	HP (MW : 13 000)	29 nM	
	Chondroïtine sulfate C (MW : 50 000)	27 nM	
	HS (MW : 16 000)	15 nM	
	Acide hyaluronique (MW : 757 000)	211 nM	
	HS non fractionné	1260,2 nM	Résonance plasmonique de surface [365]
	HS non fractionné	0,8 µM	Fluorescence [365]
	Dermatane sulfate non fractionné	6 µM	
	HP	3,4 ± 1,7 nM	Spectrométrie à scintillation [216]

Tableau 8 : Exemple de constantes de dissociation entre MCP-1 et des GAGs.

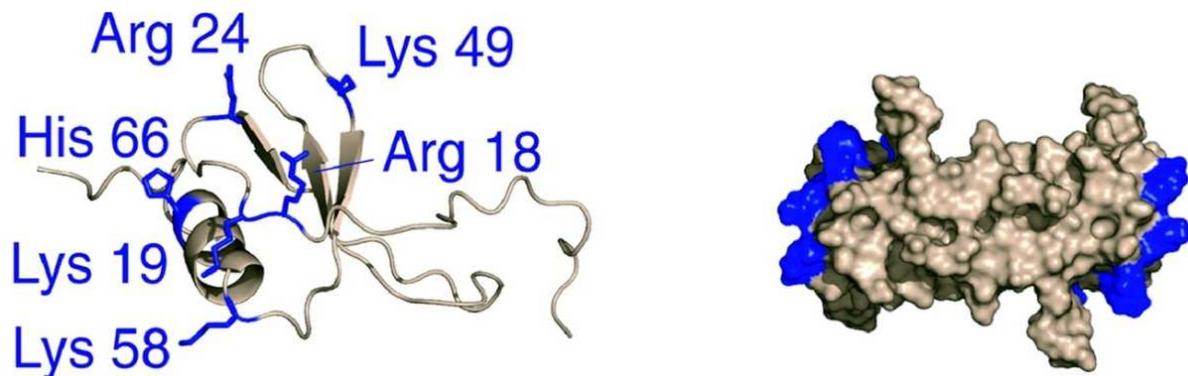


Figure 17 : Modélisation de l'interaction MCP-1/HP.

(Gauche) : Structure de la chaîne protéique. (Droite) : Surface moléculaire du dimère. Les zones en bleu correspondent aux résidus basiques de la protéine susceptible d'interagir avec HP [52].

Aucun hétérodimère avec MCP-3 n'a été observé. En utilisant la spectrométrie de masse et la RMN, ils ont montré que l'hétérodimère MCP-1/MCP-2 est prédominant en solution par rapport à l'homodimère MCP-1/MCP-1 [357].

En résumé, les données présentées dans la littérature indiquent que certains ligands de CCR2 peuvent former préférentiellement des hétérodimères stables au lieu d'homodimères et que ces interactions, comme pour celles des homodimères, peuvent être influencées par des GAGs.

Interaction de MCP-1 avec les GAGs

Les chimiokines n'interagissent pas uniquement avec des récepteurs, sous la forme de différents états oligomériques pouvant induire différentes réponses de signalisation ; elles interagissent également avec les GAGs [100] qui stabilisent la formation des oligomères. Par exemple, MCP-1 a une affinité d'environ 1,5 μ M pour l'HP non fractionnée [217, 364] (Tableau 8).

Le site de liaison de la chimiokine MCP-1 à HP a été identifié par mutagenèse. Les résidus impliqués sont K58, H66 [364] et R18, K19, R24, K49 [217, 227] (Figure 17). La modélisation de la structure des dimères indique que les sites de fixation des GAGs sont différents des sites d'interaction entre les deux protéines, contrairement à SDF-1.

La spectrométrie de masse ESI a permis de montrer que la chimiokine MCP-1 lie préférentiellement les GAGs sous forme de dimère [357, 359, 366, 367]. Des complexes non covalents entre MCP-1 et Arixtra[®] (pentasaccharide synthétique d'HP) ont été mis en évidence. Les complexes adoptent principalement une stœchiométrie 2/1 ; et le dimère, en absence d'Arixtra[®], se dissocie à des énergies d'activation relativement faible [358]. Le pentasaccharide d'HP Arixtra[®] semble donc stabiliser le dimère en phase gazeuse. Des complexes de stœchiométrie 1/1 et 2/2 ont également été observés en présence d'HP [366] mais en plus faible quantité. La modélisation moléculaire indique cependant que le dimère MCP-1/HP serait de stœchiométrie 2/2.

Des analyses par ultracentrifugation et modélisation indiquent que HP peut également induire l'oligomérisation en tetramère ou octamère [52, 217]. Des trimères et tetramères sont aussi capables de se former en présence d'Arixtra[®], mais aux intensités mesurées, ces résultats peuvent être d'une importance limitée [358]. La modélisation de la structure des tetramères indique la présence d'une surface continue de résidus basiques

encerclant les quatre protéines et probablement correspondant aux sites de liaison des GAGs [52, 217]. La stœchiométrie du tetramère en présence d'HP reste à déterminer.

I.B.3.4.3 L'interféron gamma humain (IFN γ)

Les interférons sont des protéines de la famille des cytokines. Découverts en 1957 par Isaacs et Lindenmann, trois types d'interférons coexistent : type I, II et III. Les interférons de type I (IFN α et IFN β) ont une activité antivirale. Ils protègent les cellules contre les infections virales en induisant la synthèse de diverses protéines, notamment des enzymes qui inhibent la réplication virale. Les interférons de type III (IFN- λ) ont été découverts récemment. Bien qu'ils interagissent avec un récepteur différent de celui des interférons de type I, ils induisent une cascade de signalisation très semblable à celle des interférons de type I et stimulent l'expression des mêmes gènes. L'interféron de type II (IFN γ) est appelé également l'Interféron immun car il est sécrété par les lymphocytes T de type CD4+ et CD8+ et les cellules NK [368]. Sa sécrétion est stimulée par l'interleukine 18 aussi appelée IGIF (Interferon-gamma Inducing Factor).

Structure de l'IFN γ

Bureau *et al.* ont localisé le gène de l'IFN γ humain sur le chromosome 12q25. Ce gène de 6 kb contient trois introns et quatre exons codant pour un polypeptide de 166 acides aminés dont les 23 premiers constituent la séquence signal [369, 370]. Une fois la séquence signal clivée, la forme active de l'IFN γ humain est une glycoprotéine homodimérique composée de deux polypeptides de 143 acides aminés (17,1 kDa).

Chaque polypeptide possède deux sites de glycosylation sur les résidus Asn en position 25 et 97 (sans le peptide signal) [371-375]. L'IFN γ ne possède pas de cystéines dans sa séquence, ce qui exclut toute forme tertiaire liée à des ponts disulfures. Chaque polypeptide est constitué par 7 hélices α (A à F, constituées de 9 à 21 résidus) liées par des boucles et une extrémité C-terminale (résidus 124-143) qui est flexible et peut adopter des conformations variées [376] (Figure 18). La région C-terminale contient deux domaines de résidus basiques (D1 : 125-131 et D2 : 137-140) qui semblent jouer un rôle important dans l'activité de la protéine [377]. Ces domaines confèrent également une sensibilité aux attaques protéolytiques [378-381]. Sous forme cristalline et non glycosylée, l'IFN γ est un homodimère (Figure 18) de 34 kDa stabilisé par des liaisons non covalentes et par

l'imbrication des hélices α des deux polypeptides. L'agencement des polypeptides se fait de façon à ce que l'extrémité N-terminale d'un polypeptide soit à proximité de l'extrémité C-terminale de l'autre polypeptide.

Comme beaucoup d'autres cytokines, l'IFN γ exerce de multiples fonctions et est capable de réguler plus de 200 gènes distincts [382]. Il est un facteur clé dans la régulation des différents stades de la réponse immunitaire puisqu'il possède des propriétés antivirales, antiprolifératives et immunomodulatrices [383, 384]. Il participe également à la régulation de diverses protéines de la matrice extracellulaire.

L'IFN γ possède aussi une activité pro-inflammatoire importante [385] et semble être un médiateur dans l'athérosclérose, une maladie inflammatoire chronique des vaisseaux [386]. De même, pour la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, le taux d'IFN γ détecté dans le sang est supérieur à la normale [387]. Lorsque la production de l'IFN γ est dérégulée, des maladies auto-immunes peuvent être développées, ce qui est le cas pour l'arthrite rhumatoïde, les scléroses, le diabète de type I, la schizophrénie ainsi que des maladies auto-immunes de la peau [388].

Le récepteur de l'IFN γ

L'IFN γ transmet son signal aux cellules cibles *via* un récepteur spécifique, l'IFN γ R. IFN γ R est exprimé de manière ubiquitaire à la surface de la grande majorité des cellules [389]. Le récepteur est composé par deux sous-unités polypeptidiques : IFN γ R α et IFN γ R β . La sous-unité α (472 résidus) contient un domaine extracellulaire (228 résidus), une région transmembranaire (24 résidus) et un domaine intracellulaire (220 résidus). La partie intracellulaire contient un site de fixation à Jak1¹² qui est riche en résidus Ser et Thr. Ces résidus seront pour la plupart phosphorylés durant la signalisation. La sous-unité IFN γ R α permet l'interaction avec l'interféron gamma, avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Kd = 0,1 – 1 nM) [390]. L'IFN γ R α est associée avec une autre protéine transmembranaire, la sous-unité β du récepteur. IFN γ R β est composée d'un domaine extracellulaire (226 résidus), d'une région transmembranaire (25 résidus) et d'un domaine intracellulaire (64 résidus) qui possède un site de fixation pour Jak2 [391]. Cette sous-unité β joue un rôle moins important que la sous-unité α dans l'interaction. Cependant elle est cruciale pour la transduction du signal.

¹² Janus kinase. Famille de tyrosine-kinases cytosoliques (Jak1, 2, 3 ; Tyk2)

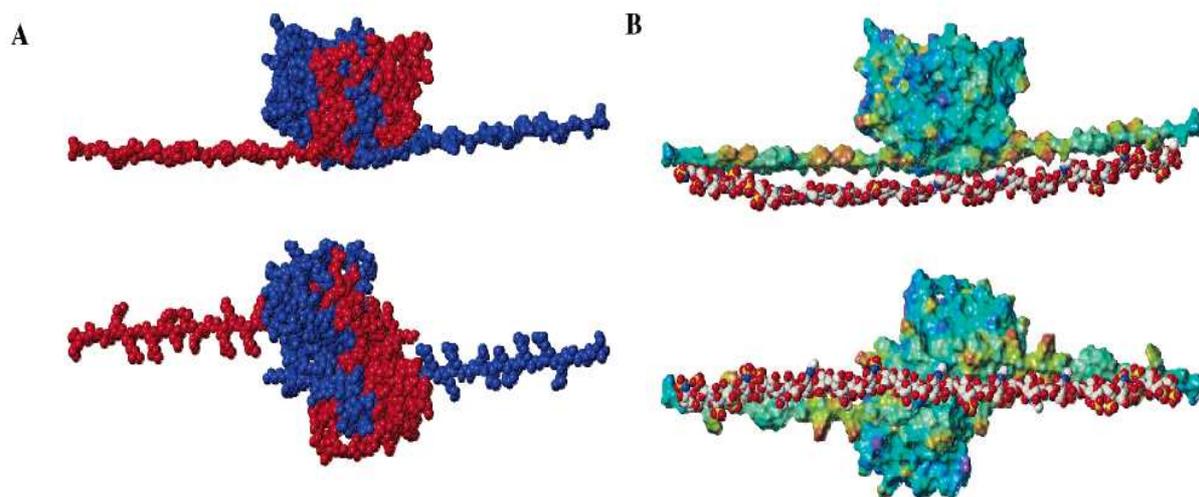


Figure 18 : Modélisation moléculaire de l'IFN γ avec les régions C-terminales étendues.

(A) Deux vues perpendiculaires de l'homodimère avec les deux polypeptides colorés en bleu et rouge. (B) Deux vues perpendiculaires de l'IFN γ interagissant avec HS [392].

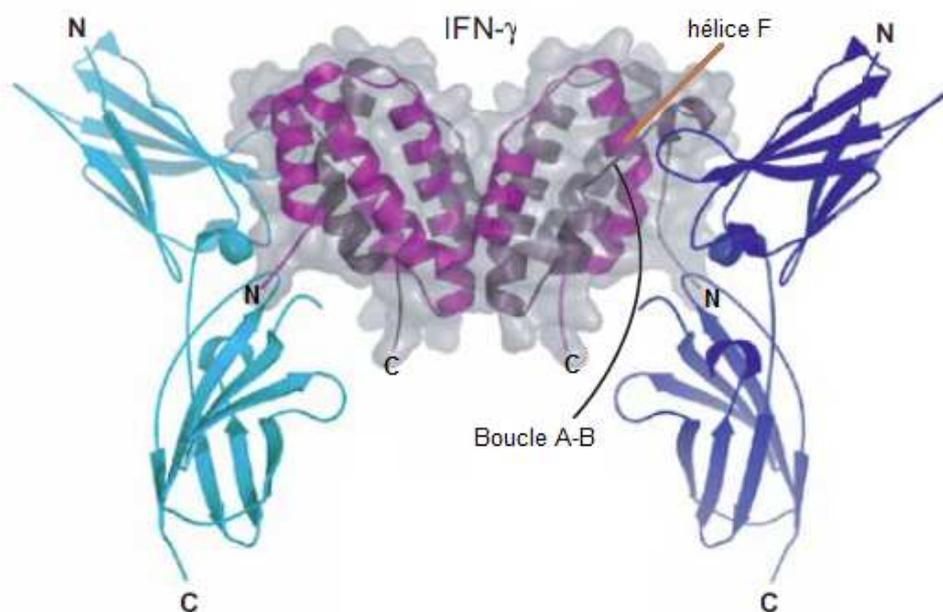


Figure 19 : Structure cristallographique du complexe entre l'IFN γ et la partie soluble de la chaîne α du récepteur (bleu/vert).

[393]

L'IFN γ , homodimérique, interagit avec un récepteur constitué par deux hétérodimères d'IFN γ R(α/β) [394]. Les éléments structuraux de l'IFN γ nécessaires à l'interaction ont été déterminés [395]. Trois régions distinctes sont importantes : la boucle entre les deux premières hélices α (boucle A-B ; résidus 18-26), une séquence de l'hélice F (108-124) et une courte région de l'extrémité C-terminale (128-131) [396, 397] (Figure 19).

Pour transmettre son signal, l'IFN γ utilise la voie de signalisation JAK-STAT (Janus Kinase - Signal Transducers and Activators of Transcription). Les deux sous-unités du récepteur interagissent au niveau de leur partie cytoplasmique avec les protéines kinases, Jak1 et Jak2 [398]. La fixation de l'IFN γ induit la dimérisation des deux sous-unités α du récepteur, permettant le rapprochement des kinases [399]. Les protéines Jak1 et Jak2 s'activent par phosphorylation croisée et permettent la phosphorylation des tyrosines du récepteur [400, 401]. Des facteurs STAT1 α ¹³ [402] viennent également interagir afin de former le facteur GAF (Gamma Activator Factor) qui, une fois dans le noyau, va se fixer sur des séquences cibles sur les gènes régulés par l'IFN γ [403].

Interaction de l'IFN γ avec HS

L'interféron gamma interagit également avec les glycosaminoglycanes. Son ligand principal est HS. La constante de dissociation, très spécifique pour cette interaction, a été évaluée à environ 1,5 nM, ce qui justifie l'intérêt porté à sa caractérisation [59]. Des études ont permis de mettre en évidence deux domaines riches en résidus basiques dans la région C-terminale de l'IFN γ , impliqués dans l'interaction avec l'HS [59, 404]. Ces domaines, KTGKRKR et RGRR, ont été nommés D1 et D2 respectivement [405]. La séquence oligosaccharidique interagissant avec la cytokine a pu être partiellement caractérisée. Il s'agit d'un domaine central N-acétylé riche en GlcA (environ 7 kDa) encadré par deux domaines N-sulfatés de 6 à 8 monosaccharides. Ces deux domaines anioniques semblent interagir avec les régions C-terminales basiques de la protéine (Figure 20).

L'interaction met principalement en jeu le domaine D1 de la région C-terminale [59]. Des analyses ont permis de mettre en évidence la fragilité des deux domaines C-terminaux vis-à-vis de la protéolyse. Le clivage des 10 derniers résidus (en aval de D1) augmente l'activité de la protéine alors qu'un clivage des 14 derniers résidus (ou plus) diminue l'activité (coupure dans ou en amont de D1) [379, 406]. La fixation de HS protège le domaine D1, mais pas le domaine D2, de la protéolyse. Cette protection représente un mécanisme de régulation de l'activité de l'interféron gamma [60].

¹³ Facteurs de transcription.

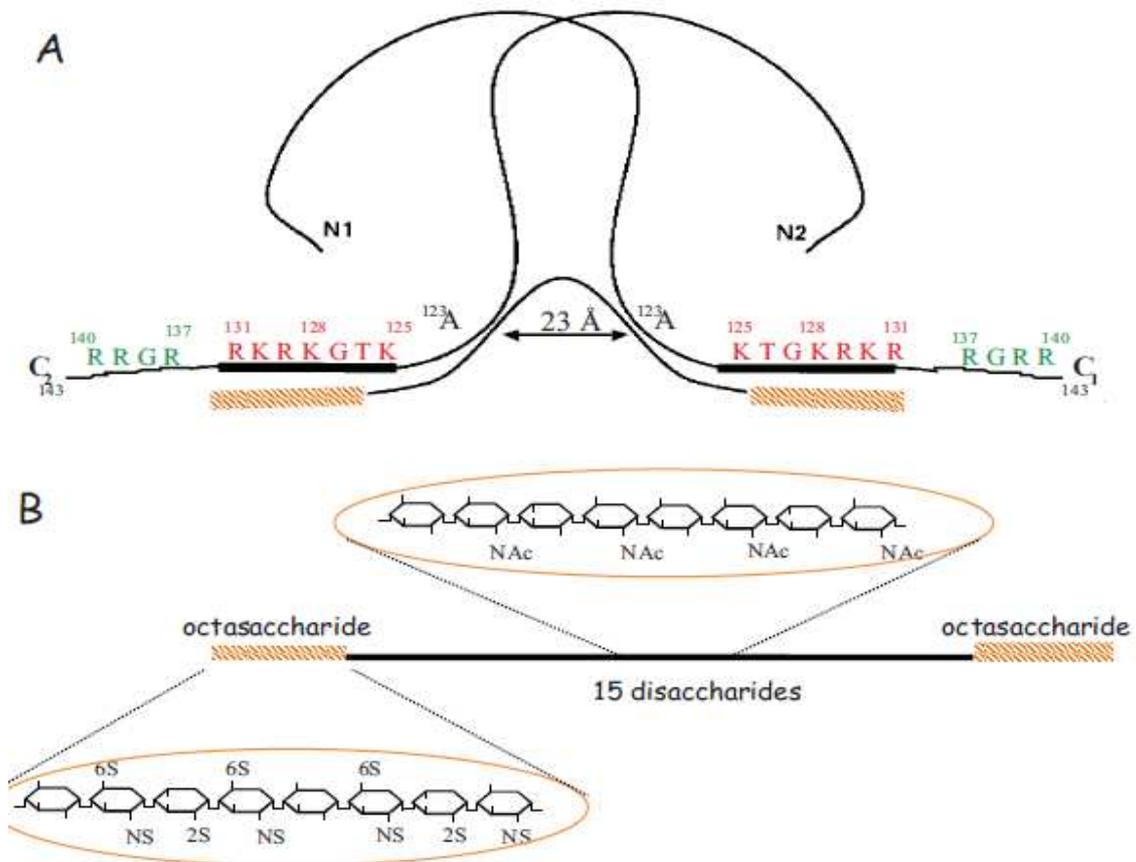


Figure 20 : Modèle de l'interaction IFN γ /HS.

(A) L'IFN γ interagit par l'intermédiaire de ses deux domaines D1 (résidus en rouge) avec un segment HS caractéristique (orange : domaines octasaccharidiques N-sulfatés reliés par un domaine N-acétylé (14-15 résidus). Le domaine D2 est représenté en vert. (B) Représentation agrandie de la séquence oligosaccharidique [407].

Ce premier chapitre a permis de mettre en avant l'importance biologique des interactions entre les cytokines, plus particulièrement SDF-1 α , MCP-1 et IFN γ , et les glycosaminoglycanes portés par les protéoglycanes. Comprendre la structure oligomérique de la protéine ainsi que la structure précise du GAG impliqué reste l'un des principaux objectifs des études réalisées.

De nombreuses méthodes d'analyses existent pour étudier les interactions protéine/GAG. Elles seront brièvement décrites dans le second chapitre de ce manuscrit. Le couplage entre l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse est la méthode qui a été utilisée au cours de cette thèse. Les trois chapitres suivants seront dédiés aux résultats obtenus pour chacune des protéines décrites ci-dessus.

CHAPITRE 2 : METHODES EXPERIMENTALES ET OPTIMISATION

II.A Méthodes utilisées pour étudier les interactions protéines/oligosaccharides

Les nombreuses méthodes d'analyse des interactions protéines / ligands (Tableau 9) ne sont pas toutes applicables à l'analyse des interactions protéines / oligosaccharides. En effet, les limitations structurales liées à l'analyse des oligosaccharides restent présentes. Seules les méthodes utilisées pour l'étude d'interactions protéine / saccharides seront abordées. La plupart consiste à analyser la protéine et les modifications conformationnelles induites par sa liaison à l'oligosaccharide, et non la structure de l'oligosaccharide proprement dit.

II.A.1 Techniques spectroscopiques

Fluorescence : c'est une méthode analytique très employée pour l'analyse d'interactions en solution de protéines et d'acides nucléiques. Les rares études d'interactions protéines / saccharides réalisées par polarisation de fluorescence concernent les lectines [408-412].

Dichroïsme circulaire : lors de la formation d'un complexe non covalent, l'absorbance mesurée sera modifiée du fait d'un changement conformationnel de la protéine [413]. Cette méthode est couramment utilisée pour la détermination de paramètres thermodynamiques, tels que les constante et vitesse d'interaction de complexes protéine / saccharide (ex : interaction antithrombine / héparine [414]).

Résonance plasmonique de surface (SPR) : c'est une méthode basée sur la mesure de la variation des propriétés optiques d'une surface d'or, sur laquelle est greffée la molécule à étudier en présence de ligands spécifiques. Dans le cas d'interactions protéines / oligosaccharides, le greffage le plus fréquent est celui de l'oligosaccharide (e.g. interaction SDF-1 α / héparine [254]) et c'est la protéine qui est mise en contact avec le ligand. La cinétique d'interaction est étudiée en temps réel [415].

	Pré-requis	Durée de l'analyse	Quantités nécessaires	Echantillon purs	Kd mol.L ⁻¹
Infrarouge à transformée de Fourier	/	Heures	µM - µL	oui	/
Fluorescence	greffage d'un chromophore	Heures	µM - mL	oui	10 ⁻⁶ à 10 ⁻¹¹
Dichroïsme circulaire	/	Heures	µM - mL	oui	10 ⁻³ à 10 ⁻⁷
Résonance plasmonique de surface	greffage du récepteur	Minutes	ng - µL	récepteur : oui ligands : non	10 ⁻³ à 10 ⁻¹³
Puces à sucre	greffage du récepteur	Minutes	/	récepteur : oui ligands : non	/
Calorimétrie	/	Heures	mg - mL	oui	10 ⁻³ à 10 ⁻⁹
RMN	/	Heures-jours	mM - mL	oui	10 ⁻³ à 10 ⁻⁹
Dialyse	/	Minutes-heures	µM - µL	oui	10 ⁻¹ à 10 ⁻¹³
Chromatographie d'exclusion stérique	/	Minutes	mM - mL	non	10 ⁻⁴ à 10 ⁻¹³
Chromatographie d'affinité	greffage du récepteur	Minutes	mM - mL	récepteur : oui ligands : non	/
Ultracentrifugation analytique	/	Heures	µg - µL	oui	10 ⁻³ à 10 ⁻⁹
Cristallographie	réalisation du cristal	Semaines	mg	oui	/
Modélisation	données structurales	Jours	/	/	/
Electrophorèse capillaire	/	Minutes	µM - nL	non en CZE oui en FACE	10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁷
Spectrométrie de masse	/	Minutes	µM - µL	oui	/

Tableau 9 : Caractéristiques techniques des méthodes d'analyse d'interactions protéines / ligands.

D'après [416, 417].

Résonance magnétique nucléaire (RMN) : c'est la méthode d'analyse structurale de complexes protéine / saccharides la plus puissante. Classiquement utilisée pour déterminer des structures primaires de composés organiques, cette méthode peut dans certaines conditions donner des renseignements sur les structures tertiaires. Généralement, les sites d'interaction sont déterminés par la modification des signaux de la protéine lors de l'ajout de ligands (ex : interaction SDF-1 α / héparine [418]), mais l'observation des signaux de petits oligosaccharides est également réalisable (e.g. interaction peptide de lectine / disaccharides [419]). En plus des structures, la RMN permet parfois de quantifier les interactions, mais une limitation apparaît pour des complexes de stœchiométries différentes de 1/1 et possédant un caractère symétrique.

Cristallographie aux rayons X : à partir d'une solution saturée en analytes purs, le solvant est évaporé sous des conditions strictes de température et de pression. Cette étape de cristallogenèse qui peut durer plusieurs jours, voire plusieurs semaines pour des protéines, donne naissance à des cristaux. L'état cristallin est caractérisé par un arrangement périodique des atomes et molécules. La diffraction par rayons X permet ensuite une détermination précise des structures moléculaires figées. Il existe tout de même des limitations dues à la présence de zones flexibles, comme les sucres des glycoprotéines par exemple. En ce qui concerne l'interaction entre protéines et saccharides, la littérature reporte principalement des études réalisées sur des petits oligosaccharides. Deux méthodes de cristallisation peuvent être envisagées : cristallisation du mélange pré-incubé (e.g. interaction lectine / chitine [420]) et cristallisation de la protéine puis dépôt du cristal dans une goutte d'oligosaccharide (ex : interaction SDF-1 α / héparine [418]).

II.A.2 Calorimétrie

Le dosage calorimétrique isotherme est une méthode quantitative permettant la mesure de constantes d'interaction, d'enthalpie d'échange et le calcul de stœchiométrie. Dans le cas d'une réaction exothermique par exemple, la température augmentera avec la concentration en ligand [421].

II.A.3 Méthodes hydrodynamiques

Chromatographie d'affinité : le schéma le plus courant, et aussi le plus commercialisé, correspond au greffage de l'oligosaccharide sur une phase stationnaire inerte (e.g. colonnes greffées par de l'héparine). Le mélange de protéines à étudier est ensuite injecté, et seules les protéines ayant de l'affinité pour la phase stationnaire, donc pour le saccharide, sont retenues. L'élution est ensuite réalisée par des concentrations croissantes en sels ou en solvant organique en fonction du type d'interactions mises en jeu, électrostatiques ou hydrophobes. Cette technique est très utilisée pour la purification de protéines [422]. La chromatographie d'affinité permet également de déterminer les constantes d'interaction entre protéines et oligosaccharides (e.g. interaction MCP / héparine [364]).

Ultracentrifugation analytique : l'analyse des interactions protéines / saccharides (e.g. interaction lysozyme / chitine [421]) peut être réalisée par ultracentrifugation suivant deux méthodes complémentaires : l'une basée sur la vitesse de sédimentation et l'autre sur la sédimentation à l'équilibre [423, 424]. L'ultracentrifugation par vitesse de sédimentation est la méthode la plus courante. Elle est sensible à la masse et au volume hydrodynamique de la macromolécule à étudier. Cette méthode consiste à mesurer la vitesse de sédimentation d'une molécule en fonction de sa conformation (libre ou liée), en réponse à une force centrifuge de 40000 à 60000 rpm. Les principales informations qu'elle apporte concernent l'homogénéité (en masse et en conformation) des échantillons et la présence ou non d'agrégats et d'interactions fortes avec des ligands. Dans certains cas, cette méthode permet de mesurer des coefficients de diffusion et des masses moléculaires. La sédimentation à l'équilibre n'est sensible qu'à la masse de la molécule. Cette méthode est très longue à mettre en œuvre : plusieurs jours sont nécessaires (contre quelques heures pour la vitesse de sédimentation). Elle permet d'estimer des masses moléculaires et de déterminer la stœchiométrie des complexes.

II.A.4 Mutagenèse dirigée

L'objectif principal de la mutagenèse dirigée est d'identifier les résidus aminés de la protéine jouant un rôle dans sa liaison aux oligosaccharides. La structure de la protéine doit être connue. Les résidus basiques (lysine, arginine, histidine), généralement situés en

surface de la protéine sont remplacés par des résidus neutres (e.g. alanine). La limitation principale de cette méthode est que la structure tridimensionnelle du mutant doit être la même que celle de la protéine. Les interactions avec les oligosaccharides sont ensuite étudiées avec les différents mutants par différentes méthodes, la plus courante étant la chromatographie d'affinité (e.g. interaction MCP / héparine [364]).

II.A.5 Puces à sucre

Des oligosaccharides synthétiques, parfois naturels, de séquence connue et homogène sont greffés sur une plaque mesurant quelques millimètres carrés [425]. Un mélange de protéines est alors mis au contact de la puce, des séquences de lavage éliminent les éléments non liés. Les protéines liées sont ensuite analysées après élution par fluorimétrie ou spectrométrie de masse. Cette technologie, d'abord utilisée pour l'analyse d'interactions avec les acides nucléiques, apparaît très intéressante pour les saccharides [426]. Les limitations principales, qui sont les mêmes que pour la SPR, concernent la difficulté de greffage des ligands.

II.A.6 Modélisation moléculaire

Des modèles sont construits à partir de structures prédéterminées par cristallographie, par RMN (fichiers PDB de la base de données protéiques, e.g. interaction SDF-1 α / héparine [254]) ou par homologie avec des molécules de structures proches. Les conformations les plus stables sont prédites par minimisation de l'énergie du complexe. Dans l'absolu et pour des molécules connues, cette méthode ne possède pas de limitation. Dans la pratique, la durée des calculs dépend des capacités informatiques : puissance des stations de calculs, niveau de précision et algorithmes utilisés.

La méthode d'analyse des interactions protéine / saccharide utilisée au laboratoire porte sur le couplage de deux techniques : l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse. Ces deux techniques seront décrites plus en détail.

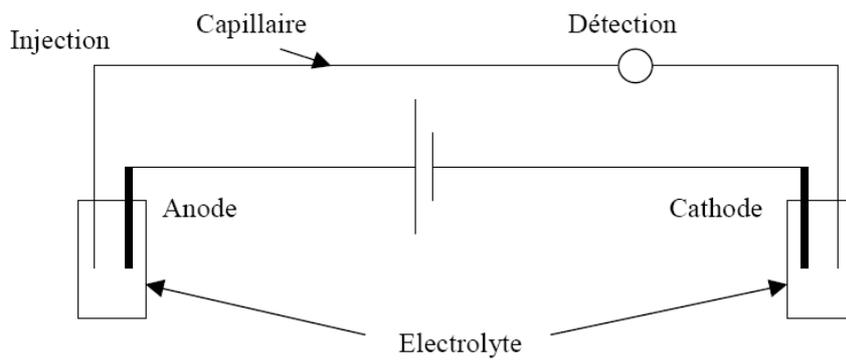


Figure 21 : Schéma de principe de l'électrophorèse capillaire.



Figure 22 : Migration des espèces en solution sous l'effet d'un champ électrique positif dans un capillaire rempli d'électrolyte.

II.B L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse est l'une des principales techniques utilisées en biologie et en chimie pour la séparation et la caractérisation des molécules. Cette technique, dont les principes furent énoncés avant ceux de la chromatographie [427], repose sur la migration d'espèces chargées sous l'action d'un champ électrique. Les milieux principalement utilisés pour ces séparations sont des gels coulés entre deux plaques en verre (amidon, polyacrylamide, agarose). Cependant, des analyses présentent des inconvénients, à savoir des temps de séparation assez longs et une faible reproductibilité. Au fil des années, des améliorations ont été apportées et des méthodes de séparation extrêmement fines ont été mises au point. Nous pouvons citer par exemple la focalisation isoélectrique (IEF) qui est une migration, induite par un courant électrique, des molécules dans un gradient de pH jusqu'à ce qu'elles atteignent un pH équivalent à leur point isoélectrique (pI), valeur de pH à laquelle elles cessent de migrer, puisque leur charge nette est nulle.

Une méthode miniaturisée a été introduite dans les années 60 : l'électrophorèse capillaire (CE). Le principe de l'électrophorèse capillaire repose sur la migration des espèces en solution, porteuses d'une charge électrique globale, soumise à l'effet d'un champ électrique. La mise en œuvre consiste à utiliser un tube capillaire ouvert à ses extrémités, en silice vierge de faible diamètre interne (25 à 100 μm). Ce capillaire est recouvert à l'extérieur de polyimide qui est un polymère lui conférant une certaine résistance mécanique. Le capillaire d'électrophorèse, d'une longueur L , est rempli de la même solution aqueuse d'électrolyte tampon que les deux réservoirs situés de part et d'autre du capillaire. On applique aux électrodes une différence de potentiel pouvant atteindre 30 kV. L'intensité ne doit pas dépasser 100 μA (soit une puissance dissipée d'environ 3 W maximum) afin d'éviter l'échauffement du capillaire, qu'il est préférable de placer dans une enceinte thermostatée (Figure 21).

Les espèces, qu'elles soient chargées positivement ou négativement, migrent en général vers la cathode (tension appliquée au niveau de l'anode) du fait du flux électroosmotique dû au déplacement de l'électrolyte. Un système de détection est placé avant l'extrémité du capillaire (Figure 22). En mode UV-visible par exemple, le capillaire coupe le trajet optique entre la source et le photomultiplicateur, ce qui permet de mesurer l'absorbance de la solution en évitant tout volume mort. La détection à la longueur d'onde de 280 nm, spécifique des groupements aromatiques (tryptophane) est souvent complétée par une détection entre 200 et 220 nm, spécifique des liaisons peptidiques. D'autres détections peuvent être envisagées : l'électrochimie [428] où de minuscules électrodes sont, dans ce

cas, insérées dans le capillaire, la fluorimétrie [429, 430], la chimioluminescence [431] et la spectrométrie de masse.

Les travaux de Jorgenson et de ses collaborateurs [432] ont montré que l'électrophorèse capillaire présente de nombreux avantages : efficacité et résolution élevées, rapidité et automatisation des séparations, faible consommation d'échantillon et de tampon de séparation, compatibilité avec de nombreux détecteurs. L'emploi d'un capillaire d'électrophorèse de faible diamètre interne permet de générer un faible effet Joule grâce à une meilleure dissipation de la chaleur et donc d'appliquer des champs électriques plus élevés par rapport à l'électrophorèse sur gel, ce qui conduit à des séparations plus rapides.

II.B.1 Injection des échantillons

Les échantillons peuvent être injectés dans le capillaire selon deux modes : hydrodynamique et électrocinétique. Le mode hydrodynamique utilise une pression qui est appliquée dans le flacon contenant l'échantillon. C'est le mode d'injection le plus couramment utilisé en électrophorèse capillaire. Le volume injecté dépend de la viscosité de l'électrolyte et des dimensions du capillaire d'électrophorèse. L'injection électrocinétique utilise une tension appliquée à l'électrode d'entrée plongée dans le flacon contenant l'échantillon. L'injection se fait en fonction de la vitesse de migration des différentes espèces. Le volume injecté dépend alors des mobilités électrophorétique et électroosmotique.

II.B.2 Séparation

L'électrophorèse capillaire permet de séparer les constituants d'un mélange en solution sur la base de leur différence de migration, lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique. Initialement, ce procédé s'applique aux particules chargées positivement ou négativement qui se déplacent par application d'un champ électrique avec des vitesses apparentes variables. Les constituants d'un mélange se séparent dans le temps sous l'effet de deux facteurs principaux : la mobilité électrophorétique μ_{ep} et la mobilité électroosmotique μ_{eo} .

II.B.2.1 Mobilité électrophorétique

Dans toute expérience d'électrophorèse, un composé porteur d'une charge électrique migre, sous l'influence du champ électrique appliqué E à une vitesse appelée vitesse de migration électrophorétique V_{ep} qui dépend de sa mobilité électrophorétique μ_{ep} . Cette mobilité est définie à partir de sa vitesse de migration observée dans un électrolyte supposé immobile et du champ électrique. On peut obtenir μ_{ep} ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) à partir d'un électrophorégramme en utilisant la formule suivante : $\mu_{ep} = L \cdot I / V \cdot t_{ep}$ (peut être négative ou positive).

Avec L = longueur totale du capillaire en cm, I = longueur utile du capillaire en cm (distance entrée-détecteur), V = tension électrique en V, t_{ep} = temps de migration de l'échantillon en s.

La mobilité μ_{ep} dépend, non seulement de la charge de l'espèce, mais de son diamètre et de la viscosité de l'électrolyte. La mobilité électrophorétique est donc d'autant plus élevée que la charge de l'ion sera élevée et son diamètre faible. Elle est nulle pour une espèce globalement neutre.

II.B.2.2 Mobilité électroosmotique

Un facteur important qui contrôle généralement la migration des solutés est la mobilité électroosmotique μ_{eo} (ou flux électroosmotique), phénomène qui fait migrer l'électrolyte dans le capillaire lorsque celui-ci est soumis à une différence de potentiel. La silice fondue du capillaire est constituée en surface de groupements silanols (SiOH) qui s'ionisent en SiO^- dès que le pH est supérieur à 2. La charge de surface de la silice devient donc négative. Localement, les cations du tampon vont neutraliser chaque groupement SiO^- . Il va donc se former un gradient de charge positive entre la surface du capillaire et le centre de celui-ci. On parle de la double couche de Stern (Figure 23). Le flux électroosmotique créé se déplace alors de l'anode (positive) vers la cathode (négative). Les charges positives se déplacent dans le sens du champ électrique et par solvatation toute la solution tampon est entraînée (Figure 24).

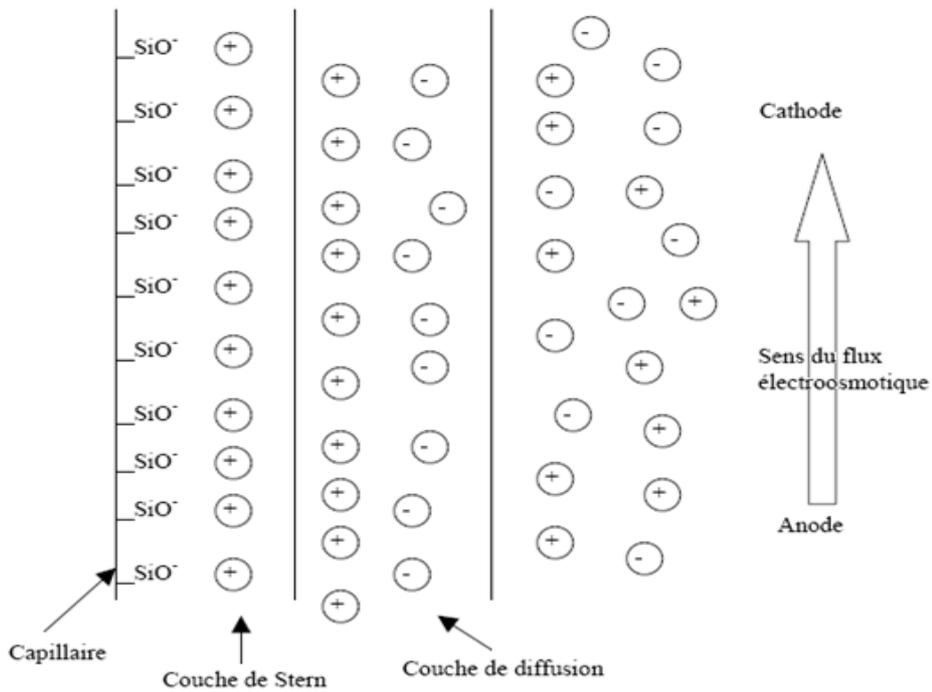


Figure 23 : Schématisation de la double couche de Stern donnant lieu au flux électroosmotique.

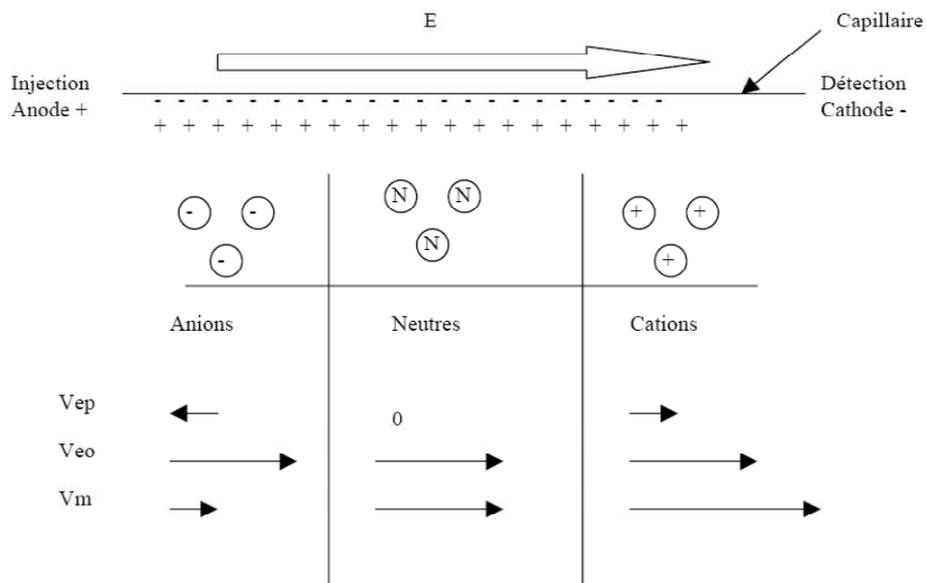


Figure 24 : Déplacement des différentes espèces, cations, anions et neutres.

La mobilité apparente μ_{app} correspond à la vitesse réelle de migration des molécules au sein du capillaire d'électrophorèse et correspond donc à la somme de la mobilité électrophorétique et de la mobilité électroosmotique : $\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$ en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

II.B.3 Analyse des protéines par électrophorèse capillaire

Les protéines peuvent être séparées par électrophorèse capillaire selon différents mécanismes en fonction de leur :

- rapport charge/masse.
- volume hydrodynamique : électrophorèse capillaire mettant en œuvre un électrolyte polymérisable permettant la formation d'un tamis sous forme de gel réticulé. On compare cette technique à la chromatographie d'exclusion stérique [433].
- point isoélectrique (pI) : électrophorèse capillaire mettant en jeu un capillaire rempli d'un mélange d'ampholytes (petits polyélectrolytes) créant un gradient de pH au sein du capillaire. Les protéines injectées migrent sous l'effet du champ électrique en suivant le gradient, et s'immobilisent lorsque le pH correspond à leur pI [434].
- hydrophobie : cette méthode emploie une phase stationnaire (ex : silice greffée C18), on parle d'électro-chromatographie [435].
- affinité pour une molécule : électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) que l'on compare à la chromatographie d'affinité.

L'électrophorèse capillaire d'affinité peut être réalisée selon trois modes. Le premier utilise une pré-incubation du mélange protéine/ligand, le second utilise le greffage d'un ligand sur les parois du capillaire d'électrophorèse [436] et le dernier met en jeu un électrolyte de séparation contenant le ligand.

Ce dernier mode, sur lequel repose cette thèse, met en œuvre une protéine qui est injectée dans un capillaire conditionné avec un électrolyte contenant le ligand. Les complexes non covalents sont alors formés pendant la durée de l'analyse et sont séparés des espèces non liées sous l'action du champ électrique. L'électrophorèse capillaire d'affinité permet donc d'étudier les interactions non covalentes entre une protéine et un ligand. Cette utilisation voit le jour au cours des années 90 [436-444]. Elle est appliquée dans différents

domaines, comme par exemple, l'étude des interactions enzyme/substrat, protéines/acides nucléiques et protéines/saccharides. L'atout majeur de cette méthode est que la liaison du ligand avec la protéine entraîne une modification de la mobilité électrophorétique démontrant l'interaction. L'allure de l'électrophorégramme résultant dépend de la cinétique de formation des complexes. En effet, si la cinétique est lente, un nouveau pic correspondant au complexe formé apparaîtra tandis que le pic de la protéine diminuera au cours du temps. Au contraire, lorsque la cinétique est rapide, le pic correspondant à la protéine sera progressivement décalé avec l'augmentation de la concentration en ligand [445]. Les mobilités apparentes obtenues à chaque concentration en ligand permettent de déterminer la constante de dissociation (K_d) de la protéine par rapport à ce ligand.

Grâce à ces différents modes d'analyse, l'électrophorèse capillaire est devenue une technique de séparation applicable à un grand nombre de molécules. Cependant, cette technique présente une faiblesse en ce qui concerne l'étude des protéines basiques (chargées positivement). En effet, la surface du capillaire présente des groupements silanols, conférant ainsi des charges négatives en surface du capillaire. Lorsqu'une protéine basique est injectée dans le capillaire, celle-ci s'adsorbe sur la surface interne du capillaire du fait des charges négatives. Dans ce cas, leur migration est très ralentie puisqu'elles vont interagir fortement avec les parois du capillaire de silice. Il est donc nécessaire d'avoir recours à une modification de la paroi [446-448], pour masquer les charges négatives de la surface interne du capillaire, de façon covalente (greffage) ou non (tapissage).

II.B.3.1 Le tapissage

Le tapissage présente de forts avantages, rendant cette modification privilégiée en électrophorèse capillaire. Le protocole de mise en œuvre est simple puisqu'il utilise uniquement une solution (tensioactifs, polymères) que l'on injecte dans le capillaire de séparation. Les molécules choisies sont neutres afin de ne pas migrer dans le capillaire et de ne pas interagir avec les complexes étudiés.

La méthode de tapissage, précédemment mise au point au laboratoire pour étudier les interactions entre une chimiokine et des GAGs [446, 447], utilise un polymère linéaire : le Poly(éthylène oxyde) (PEO) dont le motif de répétition est présenté dans la Figure 25. Ce polymère permet de masquer les charges de surfaces *via* la formation de liaisons hydrogène avec les groupements silanols de surface (Figure 26). Cependant, le polymère peut certaines fois se décrocher et polluer le spectromètre de masse lors d'un couplage CE-MS.

II.B.3.2 Le greffage

Contrairement au tapissage, le greffage, comme son nom l'indique, permet de lier le polymère de façon permanente sur les parois internes du capillaire. Le greffage utilisé dans ce travail de thèse met en œuvre un polymère neutre, l'hydroxypropylcellulose (HPC, Figure 27) pouvant se lier, par chauffage, de façon covalente aux fonctions silanols des parois du capillaire de séparation [449, 450].

Cependant, ces modifications entraînent une forte diminution du flux électroosmotique nécessaire à la migration des molécules dans le capillaire. L'ajout d'une pression hydrodynamique tout au long de l'analyse permet de pallier ce manque.

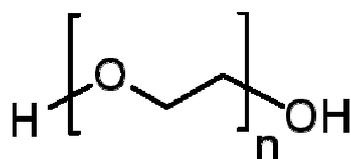


Figure 25 : Poly(éthylène oxyde) (PEO)

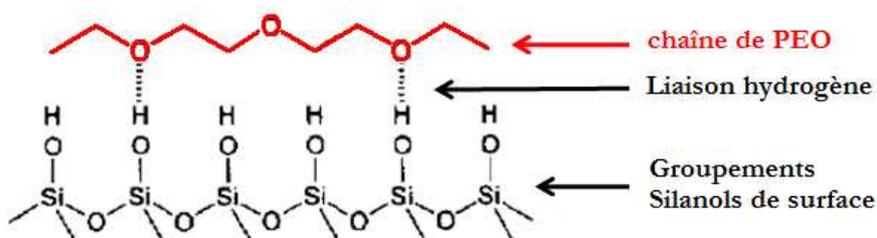


Figure 26 : Liaisons hydrogène entre le PEO et la surface du capillaire de silice.

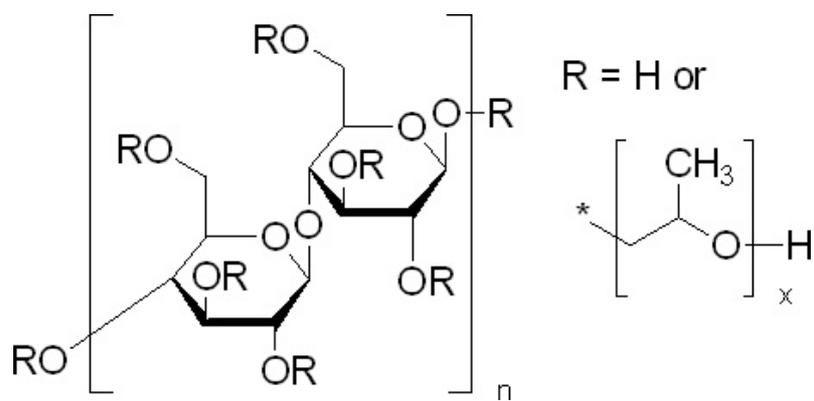


Figure 27 : Hydroxypropylcellulose

II.B.4 Méthode de calcul des constantes de dissociation par ACE

Trois méthodes de linéarisation en fonction de la concentration en héparine contenue dans l'électrolyte $[H]_0$, et des mobilités de la chimiokine libre μ_{ep}^0 et complexée μ_{ep} ont été utilisées pour déterminer la constante de dissociation (Kd) : x-réciproque (Scatchard), y-réciproque et double-réciproque [451, 452].

Les mobilités électrophorétiques sont déterminées à partir des relations suivantes :

- Mobilité électroosmotique : $\mu_{eo} = L.l / V.t_{MN} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$
- Mobilité apparente : $\mu_{app} = L.l / V.t_{prot} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$
- Mobilité électrophorétique : $\mu_{ep} = \mu_{app} - \mu_{eo} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$

Avec

L = longueur totale du capillaire (cm), l = longueur effective du capillaire (cm) (entrée – détecteur), V = tension appliquée (V), t_{MN} = temps de migration du marqueur neutre (s), t_{prot} = temps de migration de la protéine (s).

A partir de ces relations on peut linéariser les données expérimentales selon les trois méthodes ci-dessous :

- x-réciproque : $\mu_{ep}^0 - \mu_{ep} / [H]_0 = f(\mu_{ep}^0 - \mu_{ep})$ et Kd = -1 / coefficient directeur
- y-réciproque : $[H]_0 / \mu_{ep}^0 - \mu_{ep} = f([H]_0)$ et Kd = ordonnée à l'origine / coefficient directeur
- Double-réciproque : $1 / \mu_{ep}^0 - \mu_{ep} = f(1/[H]_0)$ et Kd = coefficient directeur / ordonnée à l'origine

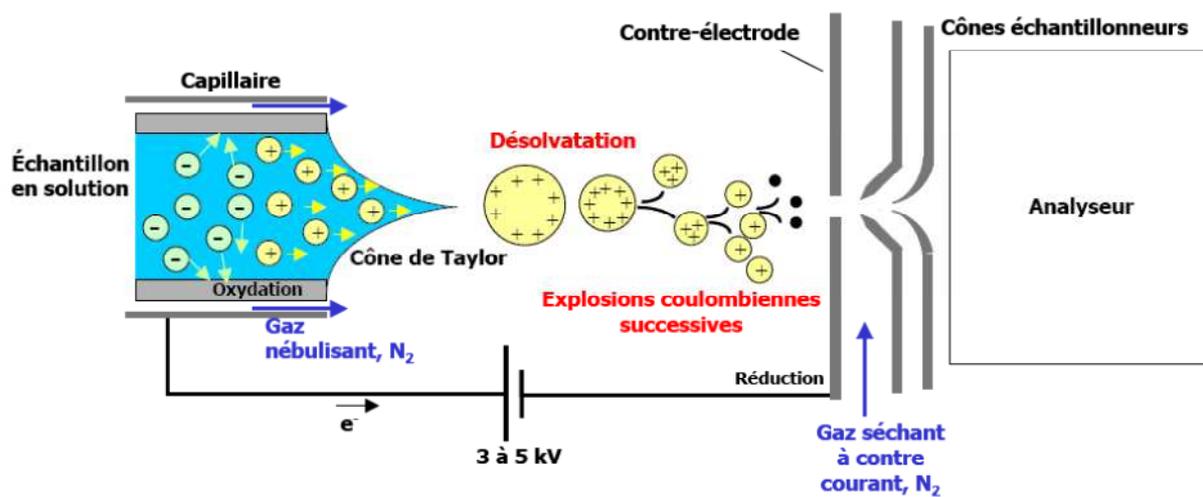


Figure 28 : Représentation schématique d'une source par électronébulisation (en mode positif).

II.C La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse consiste en la production d'ions en phase gazeuse et en la séparation de ces ions selon leur rapport masse/charge, noté m/z . Ces ions sont alors détectés en proportion de leur nombre, ce qui donne lieu à un spectre de masse : rapports m/z en fonction de l'intensité des ions. La production des ions en phase gazeuse et leur séparation selon leur rapport m/z sont réalisées respectivement au sein de la source et de(s) l'analyseur(s) d'un spectromètre de masse. L'évolution de la spectrométrie de masse s'est traduite ces 20 dernières années par le développement de nouvelles sources d'ionisation et de différents types d'analyseurs. L'analyseur utilisé sera décrit plus loin dans cette partie.

Deux méthodes de désorption-ionisation sont employées en particulier pour l'analyse de biomolécules : l'ionisation par électronébulisation (ESI pour "electrospray ionization"), et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Ces deux techniques permettent d'amener des biomolécules de poids élevé en phase gazeuse, à partir d'une phase solide (MALDI) ou liquide (ESI). L'ESI a été utilisée au cours de cette étude.

II.C.1 L'ionisation par électronébulisation (électrospray ESI)

La désorption-ionisation par électronébulisation a été développée dans les années 80 par Fenn suite aux premiers travaux réalisés par Dole à la fin des années 60 [453]. Fenn décrira par la suite le principe physique de l'ionisation par électronébulisation (prix Nobel de Chimie en 2002).

L'électronébulisation est produite par application d'un champ électrique intense à pression atmosphérique sur l'échantillon contenant l'analyte en solution, dans un tube capillaire métallique à faible débit [454]. La différence de potentiel de 3 à 5 kV entre le capillaire et la contre-électrode provoque une accumulation de charges de même signe à la surface du liquide donnant lieu à des interactions coulombiennes fortes (Figure 28). Elles provoquent la dispersion du liquide émergeant en un fin brouillard de gouttelettes chargées de forme conique, appelé cône de Taylor. Cette électronébulisation est sur la plupart des instruments favorisée par un gaz nébulisant dans un capillaire entourant le capillaire d'introduction de l'échantillon.

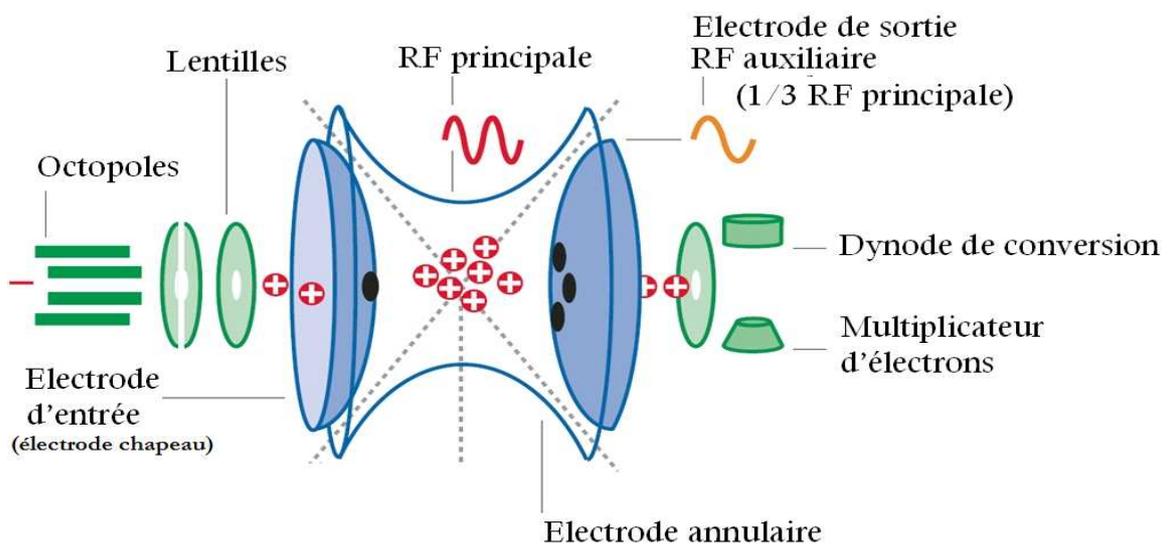


Figure 29 : Schéma d'un piège à ions quadripolaire à trois dimensions.

L'évaporation du solvant contenu dans les gouttelettes libérées, grâce à un flux d'azote séchant arrivant à contre courant du nébulisat, conduit à des gouttelettes plus petites (Figure 28). La température du gaz séchant va permettre d'évaporer plus ou moins rapidement les gouttelettes, selon la température d'évaporation du solvant. Ce processus perdure jusqu'au moment où les répulsions coulombiennes deviennent égales à la tension de surface de la gouttelette, ce qui constitue la limite de Rayleigh. A cet instant, les microgouttelettes subissent une explosion coulombienne, puis sont à nouveau réduites par évaporation du solvant. Ce processus se répète et l'analyte se trouve finalement en phase gazeuse, débarrassé de son solvant et recouvert de charges. Les ions formés sont transférés vers l'analyseur.

L'ionisation par électrospray est facilement couplée en amont à des techniques de séparation, comme la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire, moyennant une modification de l'interface d'ionisation. L'ionisation par électronébulisation conduit à la formation en phase gazeuse d'espèces multi-protonées [455], notées $[M+nH]^{n+}$ en mode positif et $[M-nH]^{n-}$ en mode négatif, avec M, masse moléculaire de la molécule considérée et n le nombre de protons porté par cette molécule ionisée (en mode positif). L'avantage de la protonation multiple des espèces est qu'elle rend possible l'analyse de molécules de haute masse moléculaire par des analyseurs de gamme de rapports m/z limitée (inférieure à 6000 Thomson dans notre cas).

L'ionisation par électronébulisation est connue comme la méthode privilégiée pour l'étude des interactions non covalentes [456-461], en particulier pour l'étude des interactions protéines/ligands, permettant ainsi la détermination rapide des stœchiométries des complexes formés. Pourtant, ce mode d'ionisation ne permet pas d'observer toutes les interactions. En effet, les interactions électrostatiques et dipolaires sont renforcées en l'absence de solvant contrairement aux interactions hydrophobes. La spécificité des interactions observées peut, dans certains cas, être discutée [462, 463].

II.C.2 Piège à ions quadripolaire (trappe à ions)

Le piège ionique (ou trappe ionique) développé au début des années 50 par Wolfgang Paul (prix Nobel de physique en 1989) est un analyseur tridimensionnel où l'analyse (MS ou MS^n) et la détection des ions s'effectuent dans un même espace, suivant des séquences temporelles successives. La trappe est constituée de trois électrodes : une

électrode centrale circulaire appelée électrode couronne (ou annulaire), placée entre deux électrodes identiques appelées électrodes "chapeau" (Figure 29).

Un potentiel $\varphi_0 = U - V \cos \Omega t$, appelé potentiel de piégeage, est appliqué à l'électrode couronne et permet de générer un champ quadripolaire conduisant au confinement des ions dans le piège. Les domaines de stabilité des ions sont déterminés par les équations de Mathieu. Les trajectoires stables des ions, au sein du champ quadripolaire résultant, sont tridimensionnelles (figure de Lissajous). Pour la manipulation des ions (éjection du piège, excitation), des potentiels oscillants de faible amplitude sont appliqués aux électrodes chapeau.

Les ions produits par la source électrospray sont focalisés et transmis vers la trappe ionique par un jeu de lentilles et de multipôles (Figure 29). Dans les trappes 3D, la capacité de remplissage ne dépasse pas une certaine quantité d'ions. Si la trappe est remplie par une quantité trop importante d'ions, les ions génèrent eux-mêmes des forces qui provoquent leur dispersion. Ce phénomène est appelé effet de charge d'espace. En pratique, l'effet de charge d'espace se traduit par une dégradation importante de la résolution et de la précision de mesure. Pour éviter cet inconvénient majeur, le nombre d'ions dans la trappe est contrôlé par un processus permettant de remplir toujours la trappe par la même quantité d'ions. Cet objectif est atteint en ajustant le temps de remplissage de la trappe de façon automatique (mode ICC : de quelques ms à quelques centaines de ms).

Pour obtenir le spectre de masse, l'amplitude de la tension alternative (V) de l'électrode annulaire est augmentée progressivement, pour éjecter séquentiellement les ions vers le détecteur en fonction de leur rapport m/z croissant.

II.D Couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse

La source d'ionisation par électronébulisation (ESI) permet l'ionisation en phase gazeuse de composés polaires ou chargés, initialement présents en solution. Cette technique d'ionisation est donc particulièrement bien adaptée pour un couplage avec l'électrophorèse capillaire et constitue la source d'ionisation la plus largement employée en couplage CE-MS. Le transfert des analytes du capillaire d'électrophorèse jusqu'à la source d'électronébulisation est assuré par l'interface. Cette interface doit également permettre d'établir le contact électrique nécessaire à la fois à l'application du champ électrique dans le capillaire de séparation et à l'application du champ électrique requis pour le processus d'électronébulisation dans la source d'ionisation. L'interface joue donc un rôle primordial dans la mise en œuvre du couplage CE-MS.

La première interface mise en place pour le couplage CE-MS a été proposée en 1987 par Olivares et al. [464]. Deux caractéristiques principales sont nécessaires pour une bonne compatibilité entre les deux techniques. La première caractéristique concerne les débits entre la CE ($\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$) et les sources ESI classiques ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), la seconde concerne l'établissement d'une jonction électrique stable.

Pour pallier au manque de compatibilité de débit de la première interface, différents types d'interfaces, plus performantes, ont été développées. On distingue des interfaces avec ou sans liquide additionnel : interface à liquide additionnel coaxial, interface à jonction liquide, interface sans apport extérieur de liquide.

L'interface utilisée au cours de cette étude est une interface coaxiale dite à 3 voies (Figure 30). Le capillaire d'électrophorèse est inséré dans un capillaire métallique central ; entre les deux circule le liquide additionnel. Un troisième capillaire, appelé capillaire externe, permet de faire circuler un gaz de nébulisation co-axialement au liquide additionnel. Le mélange entre le tampon de séparation et le liquide additionnel s'établit en sortie du nébuliseur. Une vis micrométrique permet de régler la position du capillaire d'électrophorèse dans l'interface [465].

Le liquide additionnel joue trois rôles importants dans le processus d'électronébulisation. Il permet de créer le contact électrique pour la séparation, de pallier les faibles débits de l'électrophorèse et de favoriser également le phénomène d'ionisation par sa composition chimique.

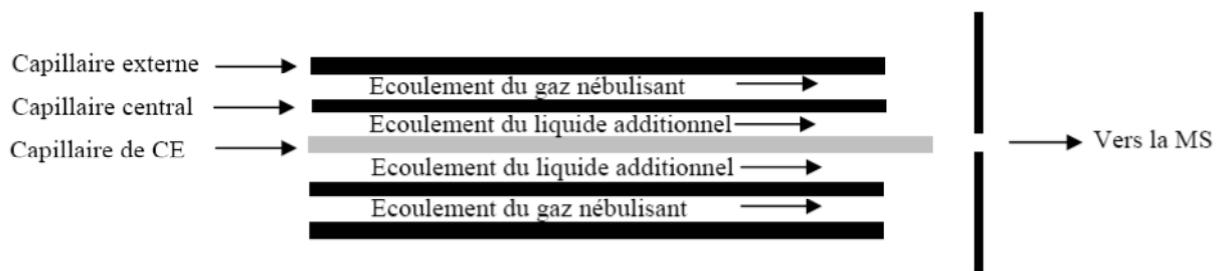


Figure 30 : Schéma descriptif de l'interface de couplage coaxiale à 3 voies.

Le liquide additionnel (1 à 10 $\mu\text{L}/\text{min}^{-1}$) [466-468] augmente donc le débit en sortie du capillaire d'électrophorèse afin d'être compatible avec le débit nécessaire à l'électronébulisation [466, 469]. Une augmentation du débit du liquide additionnel peut entraîner une dilution de l'échantillon lors du mélange des deux solutions [470, 471].

En fonction de la nature de l'analyse, le liquide additionnel, apporté à l'aide d'un pousse seringue, au débit optimisé de 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ dans notre cas, est différent.

- Les analyses en conditions dites « natives ou non dénaturantes » en mode positif sont réalisées à l'aide d'une solution d'acétate d'ammonium 20 mM (ajustée à pH 5 à l'aide d'acide acétique) ou bien une solution eau/méthanol (90/10, v/v).
- Les conditions « dénaturantes » en mode positif correspondent à une solution eau/acétonitrile (60/40, v/v) à 1% d'acide formique (AF).

II.E Optimisation des méthodes CE et MS

II.E.1 Préparation d'un nouveau capillaire d'électrophorèse

Les capillaires utilisés sont des capillaires de silice vierge de diamètre interne 50 μm , commercialisés par Phymep. Le capillaire doit être coupé à la longueur précise désirée à l'aide de la lame prévue à cet effet. La coupure doit être droite pour ne pas interférer sur l'allure des pics en électrophorèse et également sur la formation du spray lors d'un couplage CE-MS. La taille du capillaire déterminée pour le couplage CE-MS est de 98 cm. Le capillaire doit comprendre une fenêtre de détection UV (entre 5 et 8 mm) se trouvant à 21,5 cm de l'entrée du capillaire. La longueur du capillaire pour la CE seule est de 34 cm avec une longueur effective de 25,5 cm.

Afin d'enlever la protection de polyimide, la fenêtre est créée en brûlant le capillaire avec la pointe d'une flamme de briquet. Cette étape est également répétée pour les extrémités (entrée et sortie) du capillaire à raison respectivement de 5 et 8 mm.

Afin d'ôter l'amas noir dû à la brûlure, le capillaire est soigneusement nettoyé avec de l'isopropanol. Il ne doit plus y avoir de trace noire sur les longueurs brûlées.

II.E.2 Tapissage par le PEO

Le protocole de tapissage par le PEO est volontairement présenté dans ce mémoire même si aucun résultat l'utilisant ne l'est. En effet, les premières analyses, ayant par la suite conduit au choix du greffage, ont été réalisées avec un tapissage par le PEO. De plus, les durées de préparations, de conditionnement et donc d'analyses peuvent être comparées.

Les capillaires de silice, avant leur première utilisation, doivent être activés par un rinçage à la soude afin d'ioniser les groupements silanols sur la paroi interne. L'analyse de protéines basiques par électrophorèse capillaire est rendue difficile par leur forte interaction électrostatique avec les parois des capillaires de silice vierge, le recours à des capillaires modifiés devient indispensable [446]. Une méthode de modification pour les protéines basiques a été mise au point [448], à savoir le tapissage par le poly(éthylène oxyde) (PEO). Le PEO est un polymère non chargé, ce qui permet de ne pas déstabiliser les interactions électrostatiques entre protéines et oligosaccharides. Ces molécules masquent les charges de surfaces négatives du capillaire pour empêcher l'adsorption de cations, et ont pour conséquence la suppression partielle du flux électroosmotique. L'ajout d'une pression hydrodynamique tout au long de l'analyse nous a permis de pallier à l'absence du flux électroosmotique.

II.E.2.1 Solutions utilisées

Chacune des solutions préparées doit être filtrée (filtres à seringues de 0,20 μm) avant d'être placée dans un flacon. Les solutions doivent être correctement homogénéisées.

- Eau (H_2O) ultra pure (Milli-Q) produite le jour même.
- Solution stock de 100 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1M obtenue par mélange de 10 mL d'une solution commerciale à 30% dans 90 mL d'eau ultra pure. Cette solution est filtrée (filtres de 0,20 μm) puis placée dans un flacon en verre pour être stockée à température ambiante.
- Solution stock de 100 mL d'acide chlorhydrique (HCl) à 1M obtenue par mélange de 8,3 mL d'une solution commerciale à 37% dans 91,7 mL d'eau ultra pure. La solution est filtrée (filtres de 0,20 μm) puis placée dans un flacon en verre inactinique.

- Acétate d'ammonium qualité spectrométrie de masse (Sigma) : électrolyte de séparation. Une solution mère à 75 mM dans de l'eau est préparée puis ajustée à pH 6,5 avec de l'acide acétique. Elle est ensuite filtrée et conservée dans un flacon pendant 5 jours maximum.

II.E.2.2 Protocole de tapissage

Le tapissage est réalisé à l'aide d'une solution de PEO à 0,2% p/v dans 0,1 M HCl (2 mg/mL) [472, 473]. Pour éviter la décomposition du PEO par l'acide chlorhydrique, une solution stock est préparée dans de l'eau. Pour cela, 10 mg de PEO ($200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) sont ajoutés à 4,5 mL d'eau en prenant garde de bien homogénéiser l'ensemble à l'aide d'un agitateur magnétique chauffé à 95°C. Cette solution à $2,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ est stockée dans un flacon en verre à température ambiante pendant 5 jours maximum. Ensuite, 540 μL de solution stock et 60 μL d'HCl 1 M sont mélangés afin d'obtenir une solution de tapissage à 0,2% dans 0,1 M HCl.

Chaque jour les solutions contenues dans les flacons utilisés en CE (vials en plastique et/ou verre de chez Agilent Technologies) sont changées. Pour une plus grande efficacité chaque vial possède un numéro, numéro retrouvé dans les méthodes enregistrées dans le logiciel de contrôle de la CE.

II.E.2.3 Paramètres de la méthode d'activation/tapissage

Chaque méthode est enregistrée avec tous les paramètres expérimentaux.

Le premier paramètre est celui qui contrôle la descente de l'électrode dans le vial, en plus de celle réglée automatiquement. Pour nos analyses ce paramètre est réglé à 5 mm.

Le second paramètre concerne la température de la cassette renfermant le capillaire d'électrophorèse et la température du carrousel contenant les différents vials. Elles sont maintenues à 25°C respectivement par la CE et par un cryothermostat.

Le dernier paramètre concerne la définition de la position des vials d'entrée (inlet) et de sortie (outlet). En électrophorèse seule, il est nécessaire, lors de l'application de la tension, d'avoir les deux électrodes baignant dans l'électrolyte de séparation. En CE-MS

seule l'électrode d'entrée est placée dans l'électrolyte, puisque la sortie du capillaire est insérée dans l'interface de couplage, assurant la conduction électrique en sortie.

II.E.2.4 Etapes de conditionnement

Ces étapes nécessitent l'application d'une pression de 950 mbar (pression atmosphérique) dans le flacon d'entrée. Cette pression est automatiquement réglée en choisissant l'option rinçage (flush) du logiciel. Les étapes sont programmées au cours du temps de façon automatique.

Pour un capillaire CE et CE-MS les étapes sont les suivantes : H₂O 5 min, NaOH 1M 15 min, H₂O 15 min, air 15 min, H₂O 5 min, NaOH 1M 10 min, HCl 1M 15 min, PEO 0,2% 15 min et électrolyte 8 min.

Pour chaque analyse CE ou CE-MS, ce tapissage avec du PEO doit être répété.

II.E.2.5 Insertion et ajustement du capillaire d'électrophorèse dans l'interface

A la fin de la méthode de tapissage, le capillaire est placé dans l'interface de couplage ESI. Cette étape doit correctement et soigneusement être réalisée, sous peine de ne pas obtenir de spray lors de l'analyse CE-MS. Pour se faire, la vis micrométrique doit être réglée au cran 0. Pour bien placer le capillaire d'électrophorèse, il est préférable de le faire dépasser de la pointe du capillaire central (Figure 30), puis par la suite de le remonter à l'aide du plat de l'ongle jusqu'à la pointe du capillaire central. A la fin de la méthode de tapissage et lorsqu'une goutte est visible en sortie du capillaire d'électrophorèse, celui-ci est sorti de 2 crans (sens + de la vis micrométrique).

II.E.2.6 Paramètres de la méthode d'injection

La température est de 25°C et les vials d'entrée et de sortie doivent être définis ainsi que la durée de l'analyse. Les expériences sont réalisées avec une tension positive de +10 kV en CE-MS et +8 kV en CE seule. La détection UV est effectuée aux longueurs d'onde de détection 200 et 280 nm. La pression constante appliquée pour palier à la diminution du flux électroosmotique est de 15 mbar en CE et 50 mbar en CE-MS. Par sécurité, la limite du courant à ne pas dépasser est choisie à 50 μ A.

II.E.2.7 Etapes d'injection en CE et CE-MS

Ces étapes sont lancées automatiquement. Pour un capillaire CE-MS les étapes sont les suivantes : échantillon (50 mbar 50 s), électrolyte (30 mbar 2 s). Pour un capillaire CE les étapes sont les suivantes : échantillon (50 mbar 30 s), électrolyte (30 mbar 2 s), marqueur neutre (50 mbar 2 s) et l'électrolyte (30 mbar 2 s).

En ce qui concerne le couplage CE-MS, le liquide additionnel est apporté (3 μ L.min⁻¹), *via* le pousse seringue, avant de lancer la méthode d'injection. A la fin de l'analyse, un nouveau tapissage doit être effectué, permettant ainsi d'améliorer considérablement la répétabilité des analyses.

Afin de déterminer les mobilités électrophorétiques des espèces, un marqueur de flux est injecté au cours de cette étape d'injection. Ce marqueur est une molécule neutre (alcool benzylique) plus couramment nommé marqueur neutre (MN). Il est préparé en ajoutant 1 μ L d'alcool benzylique à 10 mL de tampon de séparation, à savoir l'acétate d'ammonium 75 mM à pH 6,5.

II.E.2.8 Conditionnement pour la nuit

Le capillaire peut être réutilisé plusieurs jours. Cependant, afin d'éviter son oxydation, une étape en fin de journée est nécessaire. Elle consiste en la suppression du dernier tapissage, suivi d'un rinçage et d'un séchage par de l'air. Ces étapes se font à pression atmosphérique comme pour le tapissage. Pour un capillaire CE-MS et CE les étapes sont les suivantes : H₂O 5 min, NaOH 1M 15 min, H₂O 15 min et de l'air 15 min.

	CE L = 34 cm / l = 8,5 cm	CE-MS L = 70 cm
Température Entrée (inlet) Sortie (outlet)	25°C (carrousel et cassette) Tampon de séparation (acétate ammonium 75 mM pH 6,5) Tampon de séparation (acétate ammonium 75 mM pH 6,5)	
Conditionnement (flush 950 mbar) Etape supplémentaire (ACE)	1 min H ₂ O 2 min tampon de séparation 1 min tampon + oligosaccharide	1 min H ₂ O 2 min tampon de séparation 1 min tampon + oligosaccharide
Injection hydrodynamique	Protéine : 20 s, 50 mbar Tampon : 2 s, 30 mbar MN : 5 s, 50 mbar Tampon : 2 s, 30 mbar	Protéine : 60 s, 50 mbar Tampon : 2 s, 30 mbar
Tension appliquée (positive) Détection UV Pression appliquée Temps d'analyse (réglé)	+ 8 kV 200 et 280 nm 15 mbar 20 min	+ 10 kV - 50 mbar 40 min
Temps Total	Environ 25 minutes (contre 1h50 pour le tapissage par le PEO)	Environ 45 minutes (contre 2h15 pour le tapissage par le PEO)

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des paramètres pour une analyse CE ou CE-MS utilisant un capillaire greffé HPC.

II.E.3 Greffage par l'hydroxypropylcellulose

Le tapissage par le PEO pouvant se décrocher ou polluer le spectromètre de masse, le greffage par l'hydroxypropylcellulose a été mis en œuvre. Ce greffage a considérablement réduit le temps des analyses ACE et ACE-MS (Tableau 10) et permis la détection des complexes chimiokines / oligosaccharides de synthèse.

II.E.3.1 Préparation de la solution de HPC et remplissage du capillaire

Le greffage par HPC se fait, contrairement au tapissage, en amont de son insertion dans l'électrophorèse capillaire. Une solution aqueuse à 5% p/v de HPC est préparée en mélangeant 0,25 g de HPC (poudre) à 5 ml d'eau ultra pure. Ce mélange très visqueux est soumis à une agitation pendant 1h afin d'obtenir un mélange homogène. Il est injecté dans le capillaire de séparation à l'aide d'un pousse seringue au débit de $0,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à l'apparition d'une goutte en sortie.

II.E.3.2 Cuisson du capillaire

Afin de fixer de façon covalente le HPC aux fonctions silanols des parois du capillaire d'électrophorèse, une étape de chauffage est nécessaire. Pour se faire, le capillaire est placé dans un four utilisé en chromatographie en phase gazeuse (GC) et est soumis à différentes étapes : un palier de 2 minutes à 60°C , une augmentation progressive de la température de 5°C par minutes jusqu'à atteindre 140°C et un palier de 20 minutes à 140°C . Toutes ces étapes se déroulent sous un flux d'azote à la pression de 2 bars [449, 450, 474].

II.E.3.3 Conditionnement avant utilisation

Avant utilisation, le capillaire est rincé à l'eau directement dans l'électrophorèse capillaire pendant 15 minutes (flush). Cette étape permet d'éliminer le surplus de HPC, et également de contrôler si le capillaire est bouché ou non. Une fenêtre de détection peut être réalisée en respectant la procédure décrite précédemment. Il faut noter que plus le capillaire de séparation est long, plus il y a de risques que le greffage ne soit pas uniforme. Par conséquent, le choix de ne pas disposer d'une fenêtre de détection sur un long capillaire

d'électrophorèse (pour le couplage CE-MS) a été fait. Ceci nous a permis de diminuer la longueur du capillaire à 70 cm au lieu de 98 cm lorsqu'une fenêtre de détection est présente. Cette plus faible longueur permet également de diminuer la durée des analyses CE-MS.

A la différence du tapissage, une seule méthode d'analyse est nécessaire pour un capillaire greffé, puisqu'il n'y a pas besoin de supprimer et de recréer la modification des parois du capillaire de séparation d'une analyse à l'autre. Cette méthode est programmée de manière à regrouper le conditionnement du capillaire entre chaque analyse (rinçage et remplissage par le tampon de séparation) et les étapes d'injection. Le Tableau 10 regroupe ces différentes étapes d'une part pour un capillaire de séparation court (CE) et d'autre part pour un capillaire long (CE-MS).

Avant chaque arrêt prolongé (supérieur à 2h), le capillaire est rincé avec de l'eau (10 min) et laissé humide en plongeant les deux extrémités dans de l'eau.

Dans le but d'étudier les interactions protéine / oligosaccharide de synthèse, l'électrophorèse capillaire, puis son couplage à la spectrométrie de masse, ont été les techniques utilisées au cours de cette thèse. Les chapitres qui suivent présentent les résultats obtenus pour les trois cytokines SDF-1 α (chapitre 3), MCP-1 (chapitre 4) et IFN γ (chapitre 5). Ces résultats ont été obtenus grâce à l'optimisation du couplage, et notamment à l'utilisation du greffage HPC en CE, qui a réduit considérablement la durée des analyses.

**CHAPITRE 3 : INTERACTION SDF-1 α /
OLIGOSACCHARIDES D'HEPARINE DE
SYNTHESE**

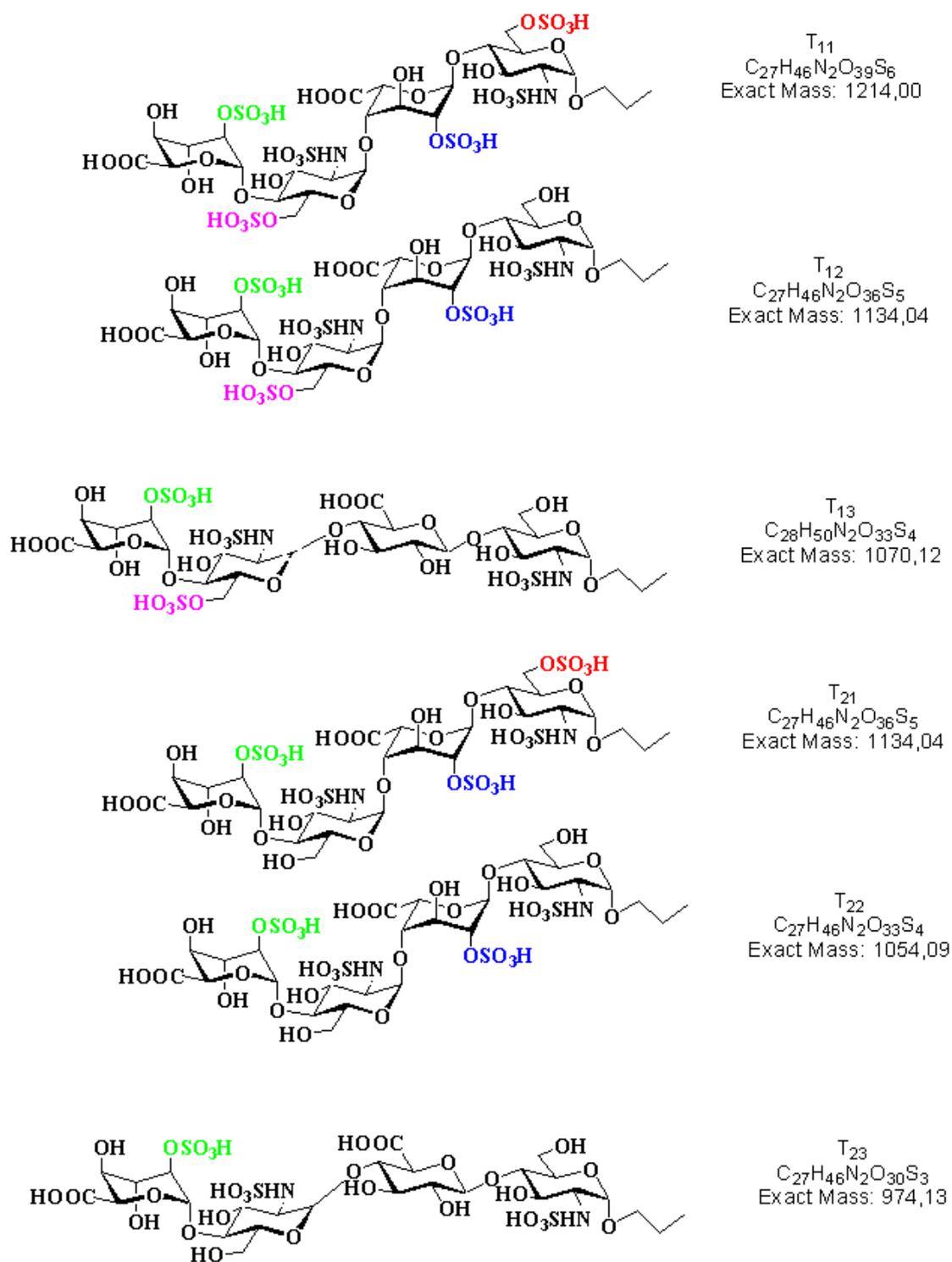


Figure 31 : Structure des tetrasaccharides de synthèse de type héparine.

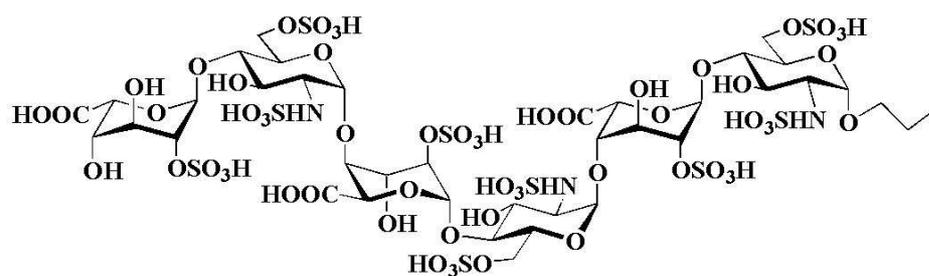
Pour chaque oligosaccharide la formule brute et la masse exacte sont indiquées. Les groupements sulfate qui diffèrent dans la structure sont notés en couleur. (Vert et rose : extrémité non-réductrice ; bleu et rouge : extrémité réductrice).

III.1 Introduction

Les chimiokines exercent leurs différents rôles (I.B.3.1) en interagissant avec des récepteurs transmembranaires spécifiques. Les chimiokines circulantes sont immobilisées et pourraient être présentées à leurs récepteurs par l'intermédiaire des glycosaminoglycanes (GAGs, majoritairement l'héparane sulfate HS et le dermatane sulfate DS) constitutifs des protéoglycanes, localisés à la surface des cellules. Les GAGs semblent favoriser l'oligomérisation de certaines chimiokines ce qui pourrait moduler ainsi leur activité [52, 80]. Cependant, la forme quaternaire, si elle existe, des chimiokines impliquées dans l'interaction avec leur récepteur n'est pas connue, comme pour un grand nombre de chimiokines dont SDF-1 α . La littérature met en évidence certaines données en ce qui concerne l'oligomérisation de SDF-1 α indiquant que le complexe SDF-1 α /héparine serait de stœchiométrie 2/1. Le couplage CE-MS a donc été introduit au laboratoire dans le but d'apporter des données supplémentaires sur l'oligomérisation de SDF-1 α en présence d'oligosaccharides d'héparine sulfatés, modèles d'héparane sulfate.

Nous avons vu dans l'introduction partie I.B.3.4.1 que la chimiokine SDF-1 α existe sous la forme d'un équilibre monomère/dimère *in vitro*, mais avec un Kd de 5 mM [475], SDF-1 α est donc toujours sous forme monomérique en solution dans les conditions physiologiques. En présence de disaccharide d'héparine, le Kd est de 170 μ M [128] et donc SDF-1 α est encore monomérique. En revanche, en présence d'héparine, le Kd est de 93 nM permettant ainsi la dimérisation de SDF-1 α [267]. Des études antérieures menées au laboratoire [476] ont montré que des tetrasaccharides sulfatés d'héparine favorisaient la formation de complexes protéine/GAG avec la chimiokine SDF-1 α . La taille minimale de ces oligosaccharides favorisant la dimérisation de SDF-1 α semble être un tetrasaccharide possédant 5 groupements sulfate. Cependant, les oligosaccharides testés étaient issus de dépolymérisation enzymatique de l'héparine, par conséquent la population des oligosaccharides était très hétérogène (taille, position des groupements sulfate). La présence de ces différentes formes d'oligosaccharide ne permettait donc pas de déterminer les constantes de dissociations (Kd).

Dans le but de lever les différents verrous (hétérogénéité en taille, nombre et position des groupements sulfate des oligosaccharides), des tetrasaccharides et un hexasaccharide ont été synthétisés à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay. Ces tetrasaccharides, dont la structure est validée par RMN, diffèrent au niveau du nombre et de la position des groupements O-sulfate dans la structure (Figure 31), ce qui devrait permettre de mettre en évidence les sites précis d'interactions du GAG avec la chimiokine SDF-1 α .



H₁₁
 $C_{39}H_{65}N_3O_{58}S_9$
 Exact Mass: 1790,97

Figure 32 : Structure de l'hexasaccharide de synthèse H11.

Les tetrasaccharides ont été nommés par un sigle Txy avec x et y, représentant une unité disaccharidique respectivement du côté non-réducteur et réducteur. Les oligosaccharides T11, T12 et T13 présentent une extrémité non-réductrice identique, et les oligosaccharides T21, T22 et T23 présentent également une extrémité non-réductrice identique mais différente par rapport à la série T1y (Figure 31). Ces oligosaccharides ont été conçus de façon à respecter l'association des motifs disaccharidiques rencontrés dans l'héparine naturelle (Tableau 2). Les trois états de sulfatation naturels sont donc représentés par ces motifs disaccharidiques : un majoritaire trisulfaté et un disaccharide minoritaire variable. De la même manière, l'hexasaccharide H11 (Figure 32) est constitué par l'assemblage de trois motifs disaccharidiques majoritaires, présentant le degré de sulfatation le plus important.

Dans la suite de ce manuscrit, les motifs disaccharidiques constitutifs des oligosaccharides synthétiques utilisés seront abrégés de la façon suivante :

- Le chiffre 1 correspond au disaccharide majoritaire idoA(2S)- α (1 \rightarrow 4)GlcNS(6S)
- Le chiffre 2 correspond au premier disaccharide minoritaire idoA(2S)- α (1 \rightarrow 4)GlcNS
- Le chiffre 3 correspond au second disaccharide minoritaire idoA- α (1 \rightarrow 4)GlcNS

Avec

idoA (acide α -L-iduronique) et idoA(2S) (acide 2-O-sulfo- α -L-iduronique)

GlcNS (2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl) et GlcNS(6S) : 2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl-6-O-sulfate

Afin de déterminer le rôle de la distribution des groupements sulfate dans l'interaction SDF-1 α /GAG synthétique, nous avons calculé les constantes de dissociation traduisant ainsi la force de l'interaction pour une structure donnée. Ces travaux ont été réalisés par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE).

De même, dans le but de déterminer la stœchiométrie des complexes formés en présence des oligosaccharides de synthèse et leur(s) effet(s) sur la complexation lorsque leur taille augmente (et donc le degré de sulfatation), nous avons utilisé le couplage en ligne entre l'électrophorèse capillaire d'affinité et la spectrométrie de masse (ACE-MS).

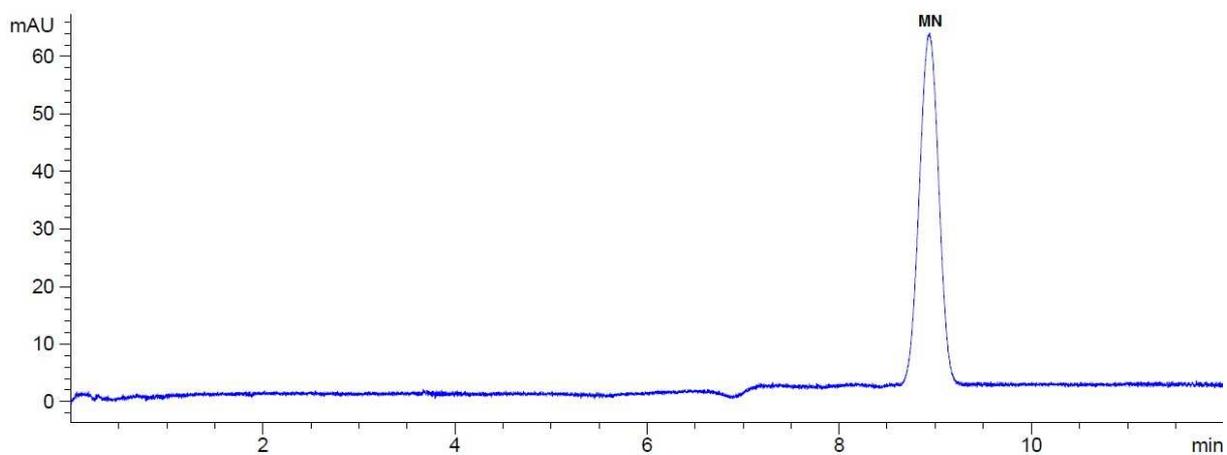


Figure 33 : Electrophorégramme du marqueur neutre (MN) sur capillaire greffé HPC.

Capillaire HPC, 50 μm d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. MN = marqueur neutre , alcool benzylique 30 mbar 2 s.

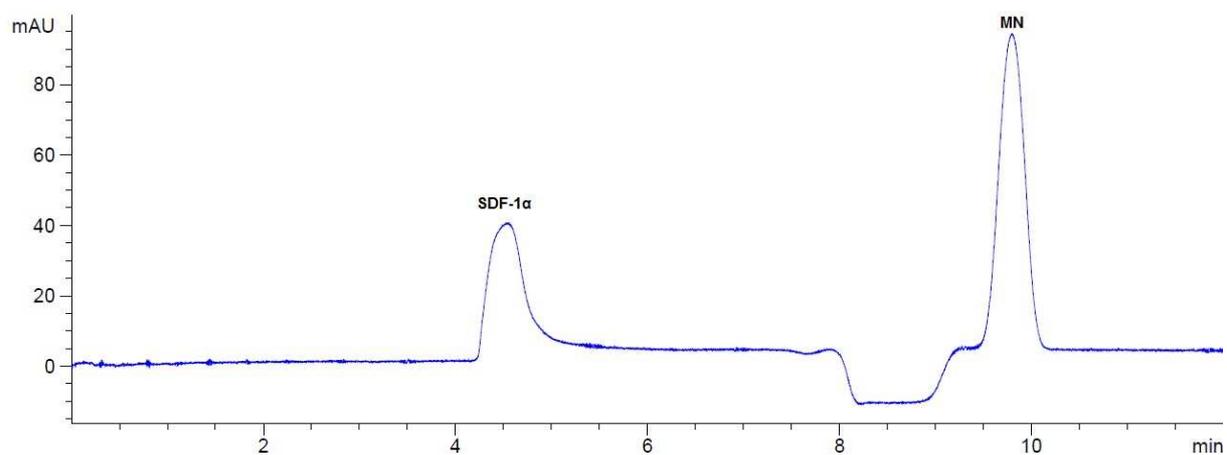


Figure 34 : Electrophorégramme de SDF-1 α sur capillaire greffé HPC.

Capillaire HPC, 50 μm d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μM ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

III.2 Etude de l'interaction SDF-1 α /tetrasaccharides de synthèse par ACE

III.2.1 Analyse de SDF-1 α par CE

La chimiokine SDF-1 α étant une protéine basique (pI 9,56), l'analyse par CE de SDF-1 α nécessite une modification des parois internes des capillaires d'électrophorèse afin d'éviter son adsorption [446, 447]. Un premier procédé de modification des parois du capillaire mis au point au laboratoire [476] avait consisté en un tapissage dynamique par le polyéthylène oxyde (PEO). Ce polymère neutre permettait de masquer les charges négatives de surface du capillaire (II.B.3.1). Cependant, ce tapissage est temporaire puisque de nature non-covalente, et nécessite une très longue préparation. Le tapissage peut facilement se décrocher, voire boucher le capillaire ou polluer le spectromètre de masse en mode CE-MS. Afin d'éviter tous ces problèmes liés au tapissage dynamique, nous avons mis au point une nouvelle modification des parois du capillaire que nous avons choisie permanente (covalente) [449, 450]. Le polymère neutre utilisé est l'hydroxypropylcellulose (HPC) (II.B.3.2). Ce greffage a rendu possible les analyses par ACE et ACE-MS, en réduisant considérablement le temps d'analyse et en augmentant le rapport signal/bruit.

La modification des parois provoque une diminution du flux électroosmotique dans le capillaire puisque les charges de surface négatives sont neutralisées ($6 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec HPC contre $8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ sans). Une pression hydrodynamique a été appliquée durant toute la durée des séparations pour compenser la diminution du flux électroosmotique et réduire le temps des analyses. Tous les paramètres (pression, tension, etc.) utilisés sont annotés dans la légende des figures présentant les résultats. Les analyses en électrophorèse capillaire ont été réalisées avec un tampon de séparation volatile d'acétate d'ammonium (75 mM pH 6,5) qui ne cause pas de suppression de signal lors du couplage avec la MS. Le marqueur neutre (MN) de flux électroosmotique est l'alcool benzylique. L'injection du MN par CE a conduit à un électrophorégramme présentant un seul pic (Figure 33). Les électrophorégrammes obtenus après l'injection de la chimiokine SDF-1 α (15 μM) laissent apparaître un pic migrant avant celui du MN, indiquant que la protéine est chargée positivement dans les conditions de pH utilisées (Figure 34). En relevant la valeur des temps de migration à l'apex des pics électrophorétiques, la mobilité électrophorétique de la protéine SDF-1 α a été déterminée : $\mu_{\text{ep, SDF-1}\alpha} = 22 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur est comparable avec la mobilité électrophorétique de SDF-1 α obtenue ($21 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) à l'aide d'un capillaire tapissé par le PEO [476].

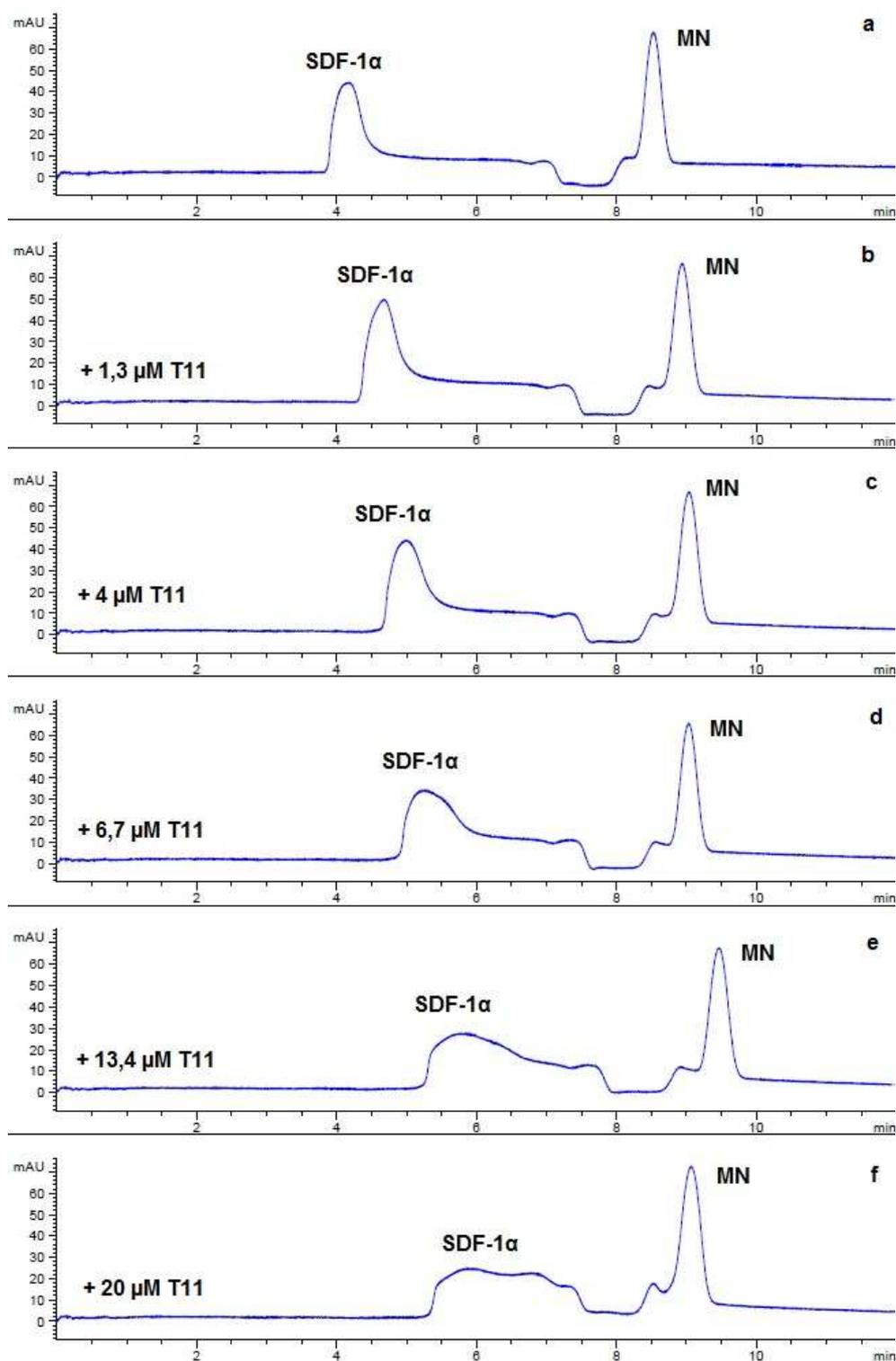


Figure 35 : Electrophorégrammes de SDF-1 α en présence de T11 en concentration croissante obtenus par ACE.

(a) 0 μ M ; (b) 1,3 μ M ; (c) 4 μ M ; (d) 6,7 μ M ; (e) 13,4 μ M et (f) 20 μ M de T11. Capillaire HPC, 50 μ m d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μ M ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

III.2.2 Rôle de la distribution des groupements sulfate dans l'interaction

En électrophorèse capillaire d'affinité, la protéine est injectée dans le capillaire contenant le ligand. Les complexes sont alors formés directement dans le capillaire durant l'analyse. La complexation provoque un décalage du pic de la protéine vers le MN. Ce décalage est plus ou moins important selon la force de l'interaction.

Ce décalage peut s'expliquer par l'interaction qui, dans notre cas, se traduit par une neutralisation des charges positives de la chimiokine par les charges négatives des groupements sulfate du GAG diminuant ainsi la charge globale de SDF-1 α . En faisant varier la concentration du ligand dans le capillaire de séparation, il est possible de déterminer les constantes de dissociation (K_d) par des méthodes de linéarisation des variations de mobilités électrophorétiques (II.B.4). Pour chaque concentration, la mesure a été effectuée au moins trois fois. Les calculs de K_d ont été effectués avec un modèle 1 dimère de SDF-1 α / 1 oligosaccharide.

- **Interaction SDF-1 α / tetrasaccharide T11**

Le tetrasaccharide T11 possède les deux unités disaccharidiques non-réductrice et réductrice trisulfatées identiques, à savoir 6 groupements sulfate.

Une gamme de concentration a été réalisée afin de déterminer le K_d pour l'interaction entre SDF-1 α et T11 : 0 μ M de T11 dans l'électrolyte puis 1,3 μ M ; 4 μ M ; 6,7 μ M ; 13,4 μ M et 20 μ M. Cette gamme a été reproduite quatre fois afin d'obtenir une meilleure détermination de la constante de dissociation. Les mobilités électrophorétiques de la protéine libre et complexée sont déterminées pour chaque série. La Figure 35 présente les électrophorégrammes obtenus pour une série d'analyses. Les trois autres séries sont regroupées dans l'Annexe 1.

Chaque électrophorégramme est constitué de 2 pics : le marqueur neutre et la protéine complexée ou non à des temps de migration plus faibles. Le temps de migration (apex des pics) est relevé afin de calculer la mobilité électrophorétique de la chimiokine libre et complexée (II.B.4).

	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
[T11] μM	série 1	série 2	série 3	série 4
0	22,6	22,3	23,5	21,5
1,3	18,6	18,4	18,2	18,3
4	16,1	16,3	16,2	15,9
6,7	14,9	14,4	14,5	13,8
13,4	11,3	12,7	11,8	12,7
20	8,9	10,9	9,5	9,7

Tableau 11 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T11.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	3,41E-06	4,55E-06	2,38E-06
Série 2	2,67E-06	3,19E-06	2,24E-06
Série 3	2,08E-06	2,93E-06	1,50E-06
Série 4	3,45E-06	3,52E-06	3,11E-06
Moyenne par méthode	2,90E-06	3,55E-06	2,31E-06
Moyenne des 3 méthodes Kd T11	2,92 \pm 0,62 μM		

Tableau 12 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T11 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

L'électrophorogramme obtenu avec une concentration de T11 égale à 1,3 μM (Figure 35b) montre un léger décalage du pic correspondant à la protéine SDF-1 α . La mobilité électrophorétique de SDF-1 α est donc faiblement diminuée ($\mu_{\text{ep, SDF-1}\alpha + \text{T11}} = 18,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) par comparaison avec l'électrophorogramme obtenu sans T11 ($\mu_{\text{ep, SDF-1}\alpha} = 22,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, Figure 35a).

L'augmentation croissante de la concentration de T11 dans le tampon de séparation conduit à une diminution progressive des mobilités électrophorétiques de SDF-1 α (Figure 35 c-f). L'augmentation de la concentration à 20 μM de T11 dans le capillaire de séparation entraîne également une augmentation du temps de migration de la protéine, cependant l'allure mal définie du pic ne permet pas d'extraire un temps de migration précis, donnant ainsi une mobilité estimée à environ $9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Par conséquent cette mobilité ne sera pas prise en compte lors de la détermination de la constante de dissociation. Les résultats obtenus pour les quatre séries sont rassemblés dans le Tableau 11.

L'augmentation de la concentration montre clairement une diminution progressive de la mobilité électrophorétique de la chimiokine SDF-1 α , caractéristique d'une interaction avec le tetrasaccharide T11.

Les trois équations de linéarisation ont permis de déterminer la constante de dissociation de la chimiokine SDF-1 α pour le tetrasaccharide T11. Les coefficients de corrélation (R^2) ainsi que les droites sont présentés dans l'Annexe 2.

Chacune des séries a conduit à la détermination de trois valeurs de K_d , d'après les méthodes x-réciproque, y-réciproque et double-réciproque. Une moyenne pour chaque méthode a ensuite été réalisée. La constante de dissociation finale est donc la moyenne des trois moyennes des méthodes (Tableau 12).

La constante de dissociation $K_{d_{\text{T11}}}$ calculée pour l'interaction SDF-1 α /T11 est de à **2,92 \pm 0,62 μM** .

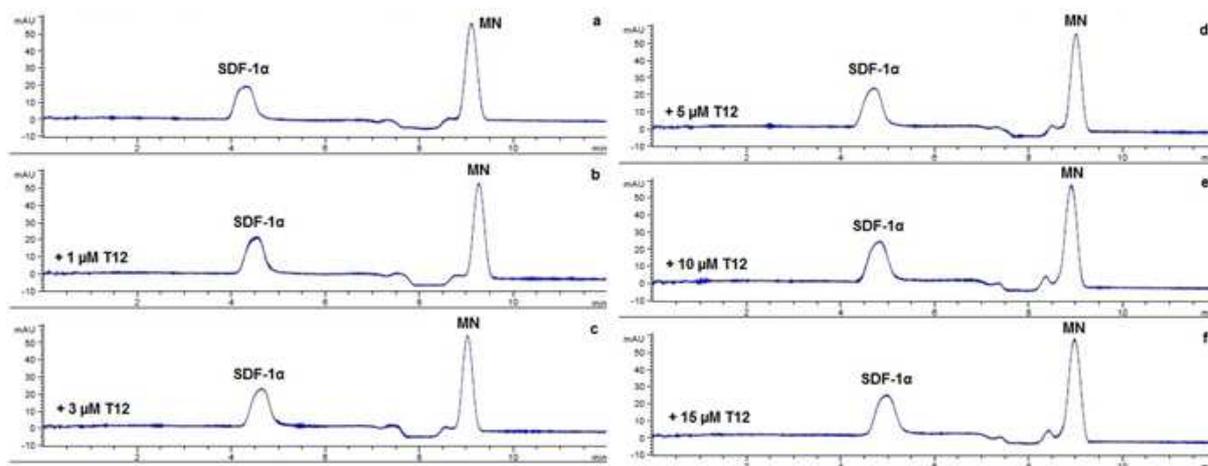


Figure 36 : Electrophorogrammes de SDF-1 α en présence de T12 en concentration croissante obtenus par ACE.

(a) 0 μ M ; (b) 1 μ M ; (c) 3 μ M ; (d) 5 μ M ; (e) 10 μ M et (f) 15 μ M de T12. Capillaire HPC, 50 μ m d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μ M ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

[T12] μ M	Mobilité μ ($\times 10^{-5}$ cm 2 .V $^{-1}$.s $^{-1}$)		
	série 1	série 2	série 3
0	22,0	23,4	22,4
1	20,3	21,2	20,4
3	18,9	19,9	19,3
5	18,3	18,8	18,5
10	17,1	17,7	17,1
15	16,2	16,6	16,0

Tableau 13 : Mobilités électrophorétiques en présence de T12.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	3,09E-06	3,80E-06	2,57E-06
Série 2	2,72E-06	3,48E-06	2,13E-06
Série 3	2,99E-06	4,15E-06	1,94E-06
Moyenne par méthode	2,93E-06	3,81E-06	2,21E-06
Moyenne des 3 méthodes Kd T12	2,98 \pm 0,80 μM		

Tableau 14 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T12 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

- **Interaction SDF-1 α / tetrasaccharide T12**

Le tetrasaccharide T12 diffère de T11 au niveau de la sulfatation du dernier ose à l'extrémité réductrice. L'oligosaccharide T12 possède donc un groupement sulfate en moins par rapport à T11. T12 est donc l'association d'un disaccharide majoritaire (1) et minoritaire (2) de l'héparine.

La gamme de concentration utilisée pour la détermination de la constante de dissociation $K_{d_{T12}}$, est la suivante : 0 – 1 – 3 – 5 – 10 – 15 μM . Cette gamme a été ajustée à partir de celle utilisée pour T11, pour laquelle la concentration de 20 μM s'est révélée trop élevée.

Trois séries d'expériences ont été effectuées, la Figure 36 présente les électrophorégrammes obtenus pour une gamme de concentration ; deux autres sont présentées en Annexe 3. La mobilité électrophorétique de la chimiokine SDF-1 α en absence de T12 est égale à $22,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (valeur proche de celle déterminée en absence de T11). Les mobilités électrophorétiques obtenues pour ces trois séries d'expériences sont rassemblées dans le Tableau 13. On remarque une différence dans l'allure des pics électrophorétiques obtenus en présence de T12 par rapport à ceux obtenus avec T11. Les pics pour T11 sont moins bien définis que pour T12, ce qui implique probablement la présence de complexes ayant une stœchiométrie différente. Cette hypothèse sera évaluée lors du couplage ACE-MS.

Tout comme T11, la présence de l'oligosaccharide T12 dans l'électrolyte conduit à une diminution progressive de la mobilité de SDF-1 α quand la concentration en T12 augmente. La linéarisation est présentée dans l'Annexe 4. La constante de dissociation $K_{d_{T12}}$ calculée pour l'interaction SDF-1 α /T12 est de à **$2,98 \pm 0,80 \mu\text{M}$** (Tableau 14). Cette valeur est quasiment identique à celle calculée pour T11 (**$2,92 \pm 0,62 \mu\text{M}$**). L'absence du groupement 6-O-sulfate de la partie GlcNS réductrice semble ne pas diminuer l'interaction entre T12 et SDF-1 α .

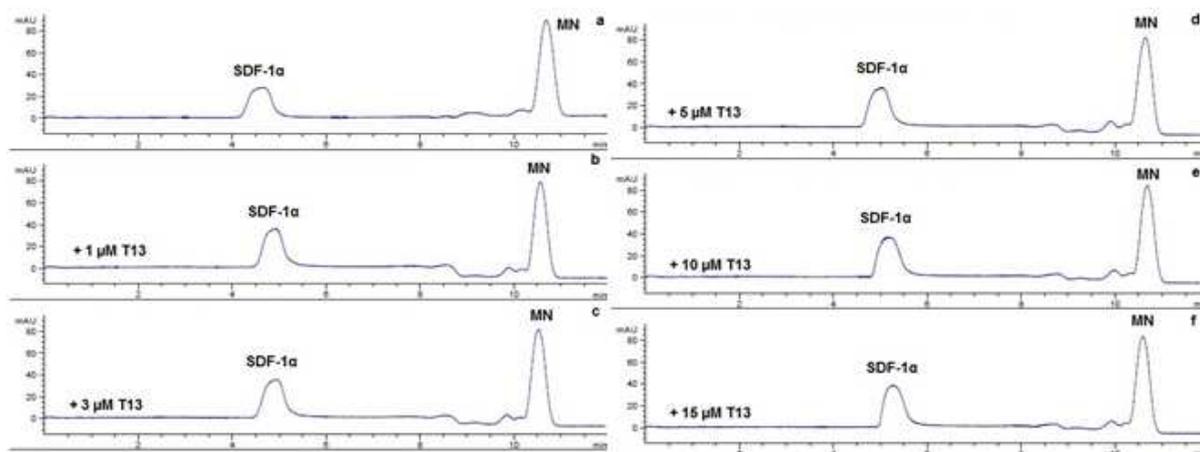


Figure 37 : Electrophorégrammes de SDF-1α en présence de T13 en concentration croissante obtenus par ACE.

(a) 0 μM ; (b) 1 μM ; (c) 3 μM ; (d) 5 μM ; (e) 10 μM et (f) 15 μM de T13. Capillaire HPC, 50 μm d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μM ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

[T13] μM	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
	série 1	série 2	série 3
0	21,5	21,8	21,7
1	20,4	20,0	19,7
3	18,4	19,5	19,5
5	19,1	19,1	19,0
10	17,8	18,4	18,0
15	16,8	17,3	17,1

Tableau 15 : Mobilités électrophorétiques en présence de T13.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	4,93E-06	6,48E-06	3,55E-06
Série 2	5,21E-06	5,74E-06	3,85E-06
Série 3	5,70E-06	6,25E-06	4,87E-06
Moyenne par méthode	5,28E-06	6,16E-06	4,09E-06
Moyenne des 3 méthodes Kd T13	5,18 \pm 1,04 μM		

Tableau 16 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T13 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

- **Interaction SDF-1 α / tetrasaccharide T13**

Le tetrasaccharide T13 présente seulement dans sa structure quatre groupements sulfate. Par rapport à T11, il ne possède plus le groupement 6-O-sulfate du GlcNS côté réducteur comme T12, et également le groupement 2-O-sulfate de l'idoA côté réducteur. T13 est la seconde association possible entre un disaccharide majoritaire et minoritaire.

De la même façon que pour T12, la gamme de concentration utilisée dans le but de déterminer le $K_{d_{T13}}$ est 0 – 1 – 3 – 5 – 10 – 15 μM . La Figure 37 présente les électrophorégrammes obtenus pour la première série. Deux autres sont présentées en Annexe 5. Les mobilités électrophorétiques des trois séries, déterminées de la même manière que précédemment, pour les concentrations 0 – 1 – 3 – 5 – 10 – 15 μM sont présentées dans le Tableau 15. L'augmentation de la concentration provoque également une diminution de la mobilité électrophorétique. Cependant les valeurs sont légèrement supérieures à celles pour T12, ce qui montre une plus faible interaction entre la chimiokine SDF-1 α et le tetrasaccharide T13. La linéarisation est présentée dans l'Annexe 6.

La constante de dissociation $K_{d_{T13}}$ calculée pour l'interaction SDF-1 α /T13 est de **5,18 \pm 1,04 μM** (Tableau 16).

L'absence du groupement 2-O-sulfate au niveau de l'idoA du côté réducteur semble diminuer la force de l'interaction SDF-1 α /T13. La sulfatation idoA(2S) du coté réducteur semble donc être nécessaire pour une bonne interaction entre SDF-1 α et un tetrasaccharide de type héparine.

- **Interaction SDF-1 α / tetrasaccharide T21**

La série T2y présente une différence au niveau de l'extrémité non-réductrice par rapport à la série T1y. Contrairement à T1y, les tetrasaccharides T2y ne possèdent pas le groupement 6-O-sulfate au niveau du GlcNS non-réducteur. T21 présente donc une structure où les deux disaccharides sont inversés par rapport à T12.

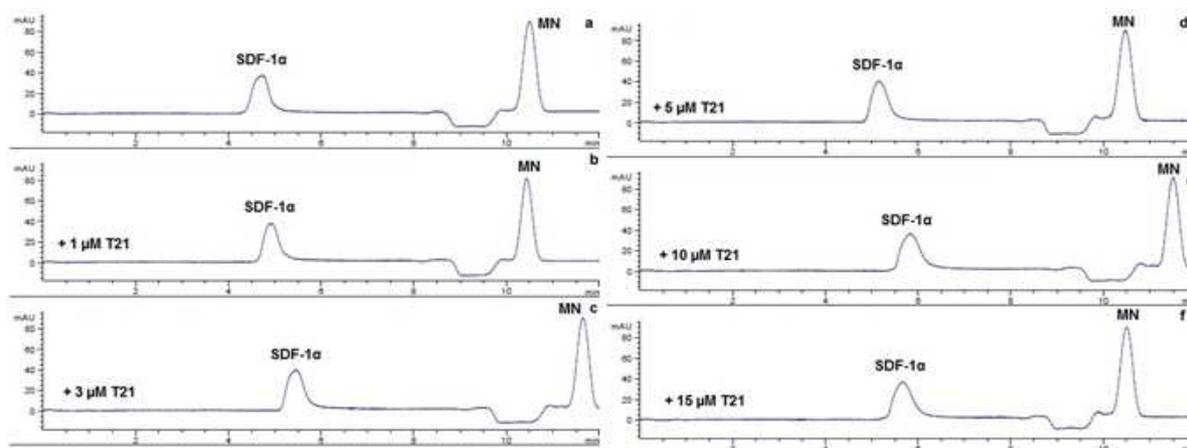


Figure 38 : Electrophorégrammes de SDF-1 α en présence de T21 en concentration croissante obtenus par ACE.

(a) 0 μM ; (b) 1 μM ; (c) 3 μM ; (d) 5 μM ; (e) 10 μM et (f) 15 μM de T21. Capillaire HPC, 50 μm d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μM ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

[T21] μM	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
	série 1	série 2	série 3	série 4
0	21,0	21,5	22,2	22,4
1	19,4	19,7	20,1	19,2
3	17,6	18,5	19,0	18,5
5	17,7	17,4	18,1	17,5
10	15,3	16,5	15,9	16,1
15	14,8	15,2	15,5	14,7

Tableau 17 : Mobilités électrophorétiques en présence de T21.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	4,10E-06	4,06E-06	4,09E-06
Série 2	5,29E-06	5,55E-06	4,74E-06
Série 3	6,45E-06	6,05E-06	5,84E-06
Série 4	4,87E-06	5,27E-06	4,40E-06
Moyenne par méthode	5,18E-06	5,23E-06	4,77E-06
Moyenne des 3 méthodes Kd T21	5,06 \pm 0,26 μM		

Tableau 18 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T21 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

Trois séries d'expériences ont été réalisées afin de déterminer la constante de dissociation. Les électrophorégrammes de la Figure 38 sont un exemple pour l'une de ces séries, les autres séries sont présentées dans l'Annexe 7. Les mobilités électrophorétiques pour les trois séries sont regroupées dans le Tableau 17. La linéarisation des résultats (Annexe 8) a permis de déterminer la constante de dissociation $K_{d_{T21}}$ pour l'interaction SDF-1 α /T21 à **$5,06 \pm 0,26 \mu\text{M}$** (Tableau 18).

Nous pouvons comparer T21 à T12, les deux extrémités non-réductrice et réductrice ont été inversées. Pour T12, on retrouve le GlcNS sulfaté du côté non-réducteur et non sulfaté du côté réducteur, et pour T21, la configuration a été inversée. La constante de dissociation $K_{d_{T12}}$ (**$2,98 \pm 0,80 \mu\text{M}$**) est plus faible que celle déterminée pour T21 (**$5,06 \pm 0,26 \mu\text{M}$**). Cet écart montre que le groupement 6-O-sulfate du côté non-réducteur est également nécessaire pour obtenir une plus forte interaction entre SDF-1 α et l'oligosaccharide, contrairement au groupement 6-O-sulfate du côté réducteur, comme il a été montré précédemment.

- **Interaction SDF-1 α / tetrasaccharides T22 et T23**

La présence des tetrasaccharides T22 et T23 dans l'électrolyte n'a pas conduit à une variation des mobilités pour la gamme de concentration 0 – 1 – 3 – 5 – 10 – 15 μM . La linéarisation des résultats n'est donc pas possible, et par conséquent aucun K_d n'a pu être déterminé. Quatre séries ont été réalisées afin de confirmer les observations. La Figure 39 présente les électrophorégrammes pour l'une des séries concernant T22. Les trois autres séries sont présentées dans l'Annexe 9. Les mobilités électrophorétiques obtenues d'après les électrophorégrammes de la gamme de concentration sont regroupées dans le Tableau 19.

Contrairement à T21, le tetrasaccharide T22 ne possède pas le groupement 6-O-sulfate au niveau du GlcNS du côté réducteur. T22 est issu de l'association de deux unités disaccharidiques minoritaires de type 2. L'association des deux unités disaccharidiques minoritaires différentes 2 et 3 (T23) conduisent à un tetrasaccharide qui ne possède aucune interaction avec la chimiokine SDF-1 α comme le traduisent les électrophorégrammes obtenus (Annexe 10) et dont les mobilités électrophorétiques sont regroupées dans le Tableau 20. Les mobilités obtenues sont quasiment identiques à la mobilité de la forme non liée de la chimiokine SDF-1 α . On peut en conclure que l'absence du le groupement 2-O-sulfate de l'idoA du côté réducteur, comme il a été montré avec T13, ne conduit à aucune interaction entre SDF-1 α et T23.

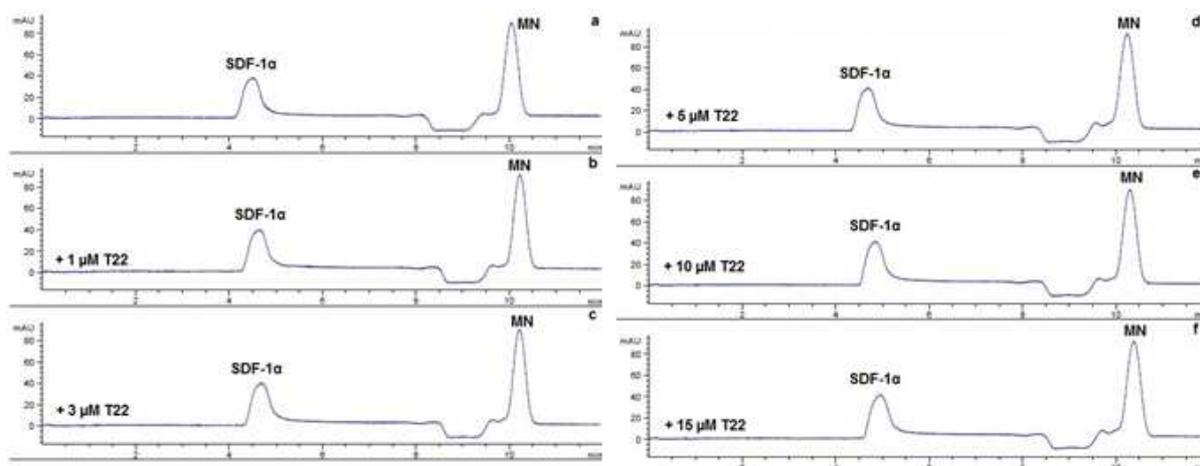


Figure 39 : Electrophorégrammes de SDF-1 α en présence de T22 en concentration croissante obtenus par ACE.

(a) 0 μM ; (b) 1 μM ; (c) 3 μM ; (d) 5 μM ; (e) 10 μM et (f) 15 μM de T22. Capillaire HPC, 50 μm d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μM ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
[T22] μM	série 1	série 2	série 3	série 4
0	22,3	22,5	23,2	23,3
1	21,3	21,2	21,7	21,6
3	21,0	21,4	21,3	20,9
5	20,9	21,5	20,7	20,4
10	19,8	20,1	20,2	19,7
15	19,2	19,4	19,2	19,3

Tableau 19 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T22.

	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
[T23] μM	série 1	série 2	série 3
0	21,9	21,8	23,2
1	21,7	20,1	21,7
3	21,9	21,3	21,7
5	21,6	21,4	21,8
10	21,1	21,4	21,4
15	20,7	21,2	21,2

Tableau 20 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T23.

- **Interaction SDF-1 α / hexasaccharide H11**

L'hexasaccharide nonasulfaté de synthèse présente un autre disaccharide majoritaire (1) dans sa séquence. L'hexasaccharide H11 est donc constitué par le tetrasaccharide T11 et un disaccharide 1. Cet oligosaccharide a été conçu dans le but de tester l'ajout de groupements sulfate et ainsi la taille de l'oligosaccharide sur l'interaction entre SDF-1 α et l'héparine.

Les concentrations de la gamme utilisées pour les tetrasaccharides se sont révélées trop élevées, et par conséquent, aucun temps de migration ne pouvait être extrait. C'est pourquoi la gamme de concentration a été réduite à : 0 – 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 μ M.

Trois séries d'électrophorégrammes, obtenues dans les mêmes conditions que précédemment, sont présentées dans l'Annexe 11. Les mobilités électrophorétiques obtenues d'après les électrophorégrammes pour chaque série sont présentées dans le Tableau 21. La linéarisation des résultats (Annexe 12) a permis la détermination de la constante de dissociation $K_{d_{H11}}$ pour l'interaction SDF-1 α /H11 à **0,22 \pm 0,06 μ M** (Tableau 22).

L'augmentation de la taille de l'oligosaccharide (T11 \rightarrow H11) apportant trois O-sulfatations supplémentaires, mène à la détermination d'une constante de dissociation $K_{d_{H11}}$ 13 fois plus faible que pour T11. Cette diminution traduit l'augmentation de l'interaction entre la chimiokine SDF-1 α et H11.

III.2.3 Conclusion

La détermination des constantes de dissociation pour les tetrasaccharides T11, T12, T13 et T21 permet de conclure sur l'influence, plus ou moins importante de certains groupements sulfates O-liés, sur la liaison. Les valeurs cohérentes (R^2) obtenues pour le calcul des constantes de dissociation *via* les trois méthodes de linéarisation montrent que le choix du modèle de stœchiométrie 1 : 1 (un dimère de SDF-1 α : 1 oligosaccharide) est justifié. Les tetrasaccharides T11 et T12 (Figure 31) conduisent à des K_d identiques (respectivement 2,92 et 2,98 μ M). Par conséquent, le groupement 6-O-sulfate du GlcNS réducteur ne modifie pas l'interaction de la chimiokine pour ces tetrasaccharides.

	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
[H11] μM	série 1	série 2	série 3
0	24,3	24,3	24,3
0,1	22,4	22,8	22,6
0,2	21,4	22,4	22,3
0,3	21,1	22,1	22,1
0,4	21,1	21,6	21,6
0,5	19,7	21,2	21,0

Tableau 21 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de H11.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	3,33E-07	2,51E-07	1,97E-07
Série 2	2,50E-07	2,63E-07	1,56E-07
Série 3	2,00E-07	2,19E-07	1,12E-07
Moyenne par méthode	2,61E-07	2,44E-07	1,55E-07
Moyenne des 3 méthodes Kd H11	0,22 \pm 0,06 μM		

Tableau 22 : Détermination de la constante de dissociation en présence de H11 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

Oligosaccharide	Degré de sulfatation	Kd (μM)
H11	9	0,22
T11	6	2,92
T12	5	2,98
T13	4	5,18
T21	5	5,06

Tableau 23 : Tableau récapitulatif des constantes de dissociation déterminées pour chaque oligosaccharide.

Cependant, lorsque le groupement 2-O-sulfate de l'idoA réducteur est en plus absent (dans T13), le K_d calculé ($5,18 \mu\text{M}$) augmente, ce qui traduit une interaction sensiblement plus faible. Si l'on retire à T11 le groupement 6-O-sulfate du GlcNS non-réducteur (donnant T21), le K_d calculé est identique ($5,06 \mu\text{M}$) à celui mesuré pour T13. Ce groupement du côté non-réducteur est donc impliqué dans l'interaction et la renforce. En suivant le même schéma que précédemment pour le côté réducteur, l'absence du groupement 6-O-sulfate réducteur (T22) ne permet plus l'interaction entre SDF-1 α et le tetrasaccharide. Cela est également vérifié par le tetrasaccharide T23 où il manque le groupement 2-O-sulfate de l'idoA réducteur. La position 6-O-sulfate non-réducteur semble être primordiale pour une forte interaction.

L'augmentation de la taille de l'oligosaccharide ligand de T11 à H11 met en évidence un renforcement de l'interaction avec SDF-1 α . Le nombre total de groupements sulfate semble ainsi également intervenir dans la force de l'interaction. La construction d'hexasaccharides de synthèse, basée sur le modèle des tetrasaccharides avec leurs différences au niveau de la position des groupements sulfate, serait très intéressante afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le rôle de la position de ces groupements sulfate.

La dimérisation en présence d'un disaccharide d'héparine conduit à la détermination d'une constante de dissociation de $170 \mu\text{M}$ ($0,17 \text{ mM}$) [128]. L'interaction avec un tetrasaccharide se traduit par un abaissement de la constante de dissociation (e.g. $2,92 \mu\text{M}$ pour le tetrasaccharide hexasulfaté T11). Les constantes de dissociation déterminées par ACE (micromolaire) (Tableau 23) sont donc d'un ordre de grandeur environ 30 fois inférieur à la littérature. Si la taille augmente encore (hexasaccharide nonasulfaté), la constante de dissociation diminue ($0,22 \mu\text{M}$) traduisant ainsi l'augmentation de la force d'interaction. Il a été montré par SPR que SDF-1 α se lie fortement à l'héparine (6 KDa) avec une affinité très forte de l'ordre de 93 nM [267], ce qui montre encore le rôle de la taille de l'oligosaccharide. Il serait donc intéressant de déterminer les constantes de dissociation en présence d'oligosaccharide de taille supérieure (octa, deca, dodecasaccharide...) afin de comparer les valeurs avec celles citées ci-dessus. L'ACE nous a donc permis de déterminer pour la première fois des K_d pour des tetrasaccharides et un hexasaccharide de synthèse en interaction avec SDF-1 α , sans pour autant déterminer exactement la stœchiométrie des complexes. Le modèle de stœchiométrie, un dimère/un oligosaccharide, semble approprié, mais il nous a paru intéressant de déterminer si la modification de position des groupements sulfate et l'augmentation de la taille de l'oligosaccharide a un rôle sur l'oligomérisation de la chimiokine.

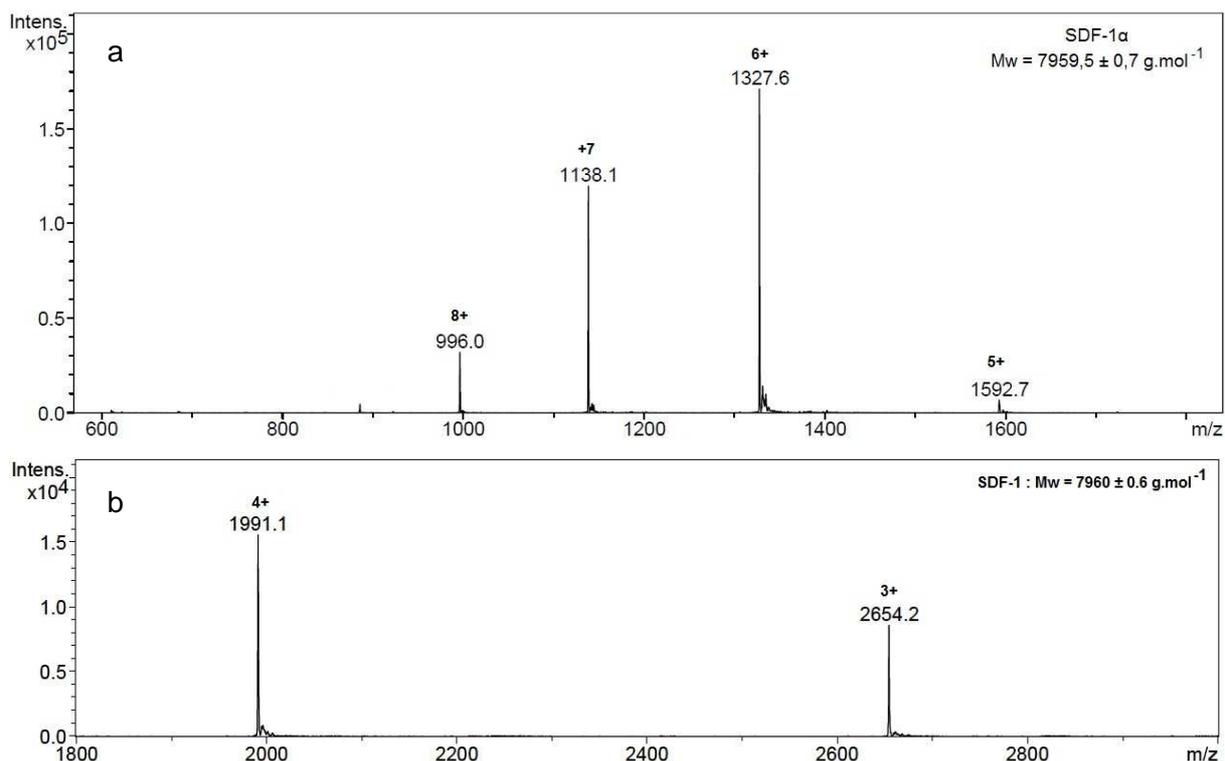


Figure 40 : Spectres de masse de SDF-1α obtenus par CE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s. Liquide d'appoint : méthanol 10% dans H₂O, 3 μL.min⁻¹. Masse cible (a) 1500 m/z, gamme de masse 600 – 1800 m/z, (b) 3000 m/z, gamme de masse 1800 – 300 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C. Masse cible (Target Mass) : commande du logiciel esquire control (Bruker) permettant de stabiliser les ions dans une gamme m/z donnée.

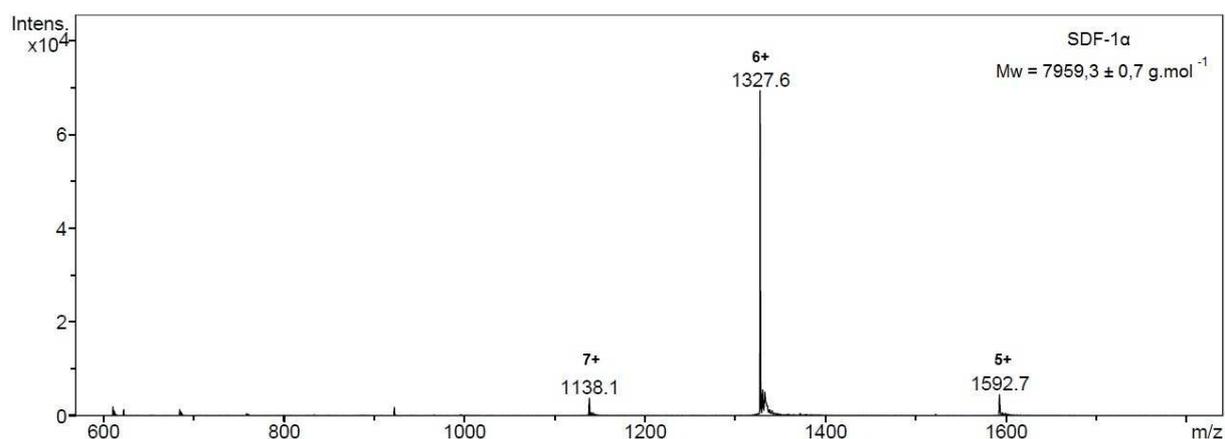


Figure 41 : Spectre de masse de SDF-1α obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s. Liquide d'appoint : acétate d'ammonium 20 mM, pH 5, 3 μL.min⁻¹. Masse cible 1500 m/z. Gamme de masse 600 – 1800 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C.

III.3 Etude de l'oligomérisation de SDF-1 α en présence d'oligosaccharides de synthèse par ACE-MS

L'influence de la position et du nombre des groupements sulfate le long de la structure d'un tetrasaccharide sur l'interaction avec SDF-1 α a été démontrée par ACE grâce à des GAGs synthétiques de structure commune. Il reste maintenant à connaître la stœchiométrie des complexes formés. Les travaux précédents menés au laboratoire ont mis en évidence des complexes de stœchiométrie 1/1 (SDF-1 α avec un disaccharide) et 2/1 (2 SDF-1 α avec un tetrasaccharide, pentasaccharide ou hexasaccharide) [447]. SDF-1 α semble se dimériser en présence d'oligosaccharide ayant un degré de polymérisation (dp) minimum de 4 possédant au moins 5 groupements sulfate. Un hexasaccharide nonasulfaté de synthèse a également été étudié en présence de SDF-1 α , dans le but de déterminer si l'augmentation de la taille de l'oligosaccharide et du nombre de groupements sulfate joue un rôle dans la stœchiométrie des complexes formés.

III.3.1 Détection de SDF-1 α par CE-MS

Dans le but de déterminer la stœchiométrie des complexes SDF-1 α /oligosaccharides de synthèse formés en solution, les conditions de couplage entre l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse ont été optimisées en premier lieu pour la détection de la protéine seule.

Le liquide additionnel utilisé pour cette analyse est un mélange eau/méthanol (90 : 10, v/v). Ce liquide, introduit à l'aide d'un pousse seringue au débit de 180 $\mu\text{L/h}$, permet d'obtenir un spray stable et de détecter SDF-1 α avec un meilleur rapport signal sur bruit que sans liquide additionnel. De plus, et cela constitue un critère de choix important, à des proportions inférieures à 50 % [477], le méthanol n'apparaît pas dénaturant. Les complexes ne seront pas déstabilisés par la faible présence de méthanol, comme il a été montré lors de précédents travaux [447, 477]. Le spectre de masse ESI (mode positif) de la protéine SDF-1 α a été obtenu après couplage d'un capillaire greffé par l'hydroxypropylcellulose au spectromètre de masse. Les états de charges observés (5+ à 8+) permettent de calculer une masse moléculaire moyenne $M = 7959,5 \pm 0,7 \text{ g.mol}^{-1}$ (Figure 40a) qui est en accord avec la masse théorique de la chimiokine SDF-1 α , $M_{\text{moy}} = 7958,3 \text{ g.mol}^{-1}$, soit un écart de 1,2 g.mol^{-1} (environ 150 ppm). Le spectre de masse de la Figure 40b a été réalisé dans la gamme de masse choisie pour les études ACE-MS, à savoir 1800-3000 m/z.

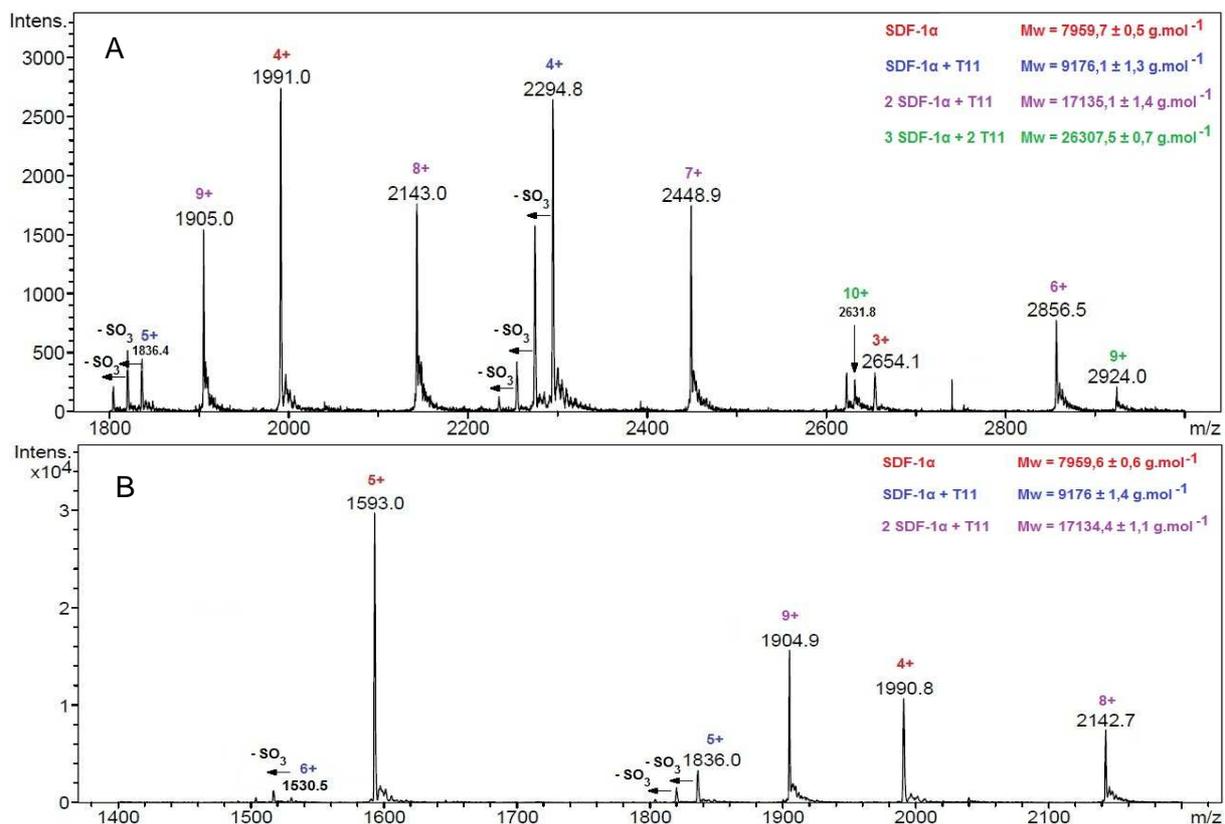


Figure 42 : Spectres de masse de SDF-1α en présence de T11 obtenus par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μM de T11; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s. Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 μL.min⁻¹. (A) Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z ; (B) Masse cible 2000 m/z, gamme de masse 1400-2200 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C.

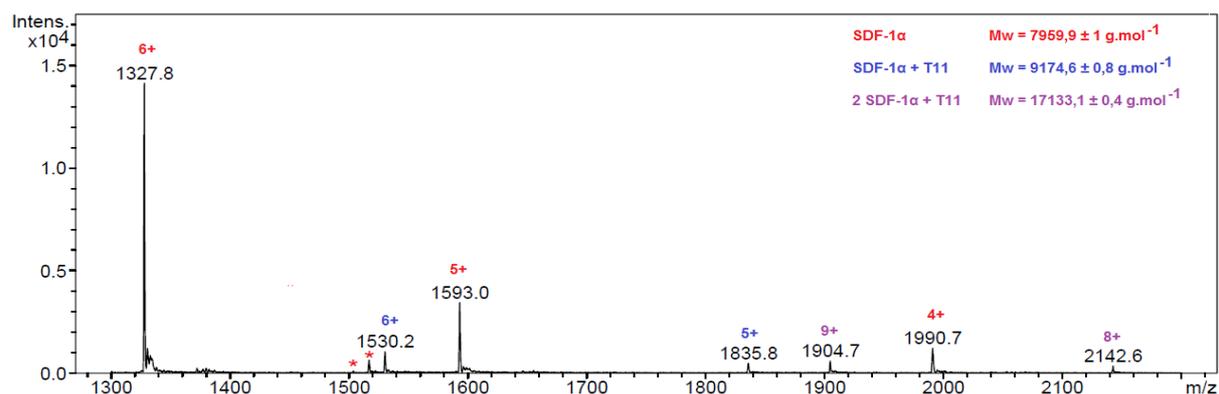


Figure 43 : Spectre de masse de SDF-1α en présence de T11 obtenu par ACE-MS dans des conditions d'ionisation douces.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μM de T11; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s. Liquide d'appoint : acétate d'ammonium 20 mM, pH 5 ; 3 μL.min⁻¹. Masse cible 2000 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C. Astérisque rouge = perte d'un groupement sulfofate.

Certains travaux présentés dans la littérature ont montré que la chimiokine SDF-1 α pouvait exister sous la forme d'un équilibre monomère-dimère en solution [278]. Une analyse a été réalisée dans des conditions d'ionisation plus douces et moins dénaturantes (liquide d'appoint : acétate d'ammonium 20 mM, pH 5) dans le but de détecter la présence d'un éventuel dimère de SDF-1 α . Aucun dimère n'est observé, même en modifiant certains paramètres comme la gamme de masse ou encore la masse cible. De plus, le changement du liquide additionnel a pour effet une faible diminution du signal par rapport à celui obtenu en présence de méthanol 10%. Ces résultats sont donc en accord avec le K_d de 5mM, indiquant que SDF-1 α est monomérique en solution. Le spectre présenté dans la Figure 41 a été obtenu dans les mêmes conditions, hormis le liquide additionnel, que le spectre de la Figure 40a. Seuls trois états de charges sont observés (5+ à 7+). Ils permettent de calculer une masse de $M = 7959,3 \text{ g.mol}^{-1}$, avec un écart de 1 g.mol^{-1} (environ 125 ppm) par rapport à la masse théorique de SDF-1 α .

III.3.2 Stœchiométrie des complexes mesurée par ACE-MS

- **Complexes formés entre SDF-1 α et le tetrasaccharide T11**

La stœchiométrie des complexes formés entre SDF-1 α et les oligosaccharides de synthèse est étudiée par ACE-MS. Elle sera toujours écrite nombre de molécules de SDF-1 α /nombre de molécules d'oligosaccharides. Chaque oligosaccharide a été introduit séparément dans l'électrolyte de séparation à la concentration de 3 μM afin de ne pas déstabiliser le spray.

La présence du tetrasaccharide hexasulfaté T11 dans l'électrolyte de séparation conduit à la formation de nouveaux ions (Figure 42a) correspondant à trois nouvelles espèces de masse moléculaire plus élevées que celle de SDF-1 α . En plus des ions à m/z 1991,0 (état de charge 4+) et m/z 2654,0 (3+) caractéristiques de SDF-1 α , une série d'ions assez intenses aux états de charge 9+ à 6+ (Figure 42a violet), correspondant respectivement à des rapports masse sur charge m/z 1905,0 ; 2143,0 ; 2448,9 et 2856,5, permet de calculer une masse moléculaire de $17135,1 \pm 1,4 \text{ g.mol}^{-1}$. Cette masse correspond à celle d'un complexe non covalent formé de deux protéines SDF-1 α ($M_{\text{théorique}} = 7958,3 \text{ g.mol}^{-1}$) associées à une molécule de T11 ($M_{\text{théorique}} = 1214,0 \text{ g.mol}^{-1}$). Une autre série d'ions en bleu apparaît aux états de charge 4+ (m/z 2294,8) et 5+ (m/z 1836,4) soit une masse moléculaire de $9176,1 \text{ g.mol}^{-1}$. Cette masse est celle d'un complexe non covalent formé par une protéine SDF-1 α et une molécule de T11 (1/1).

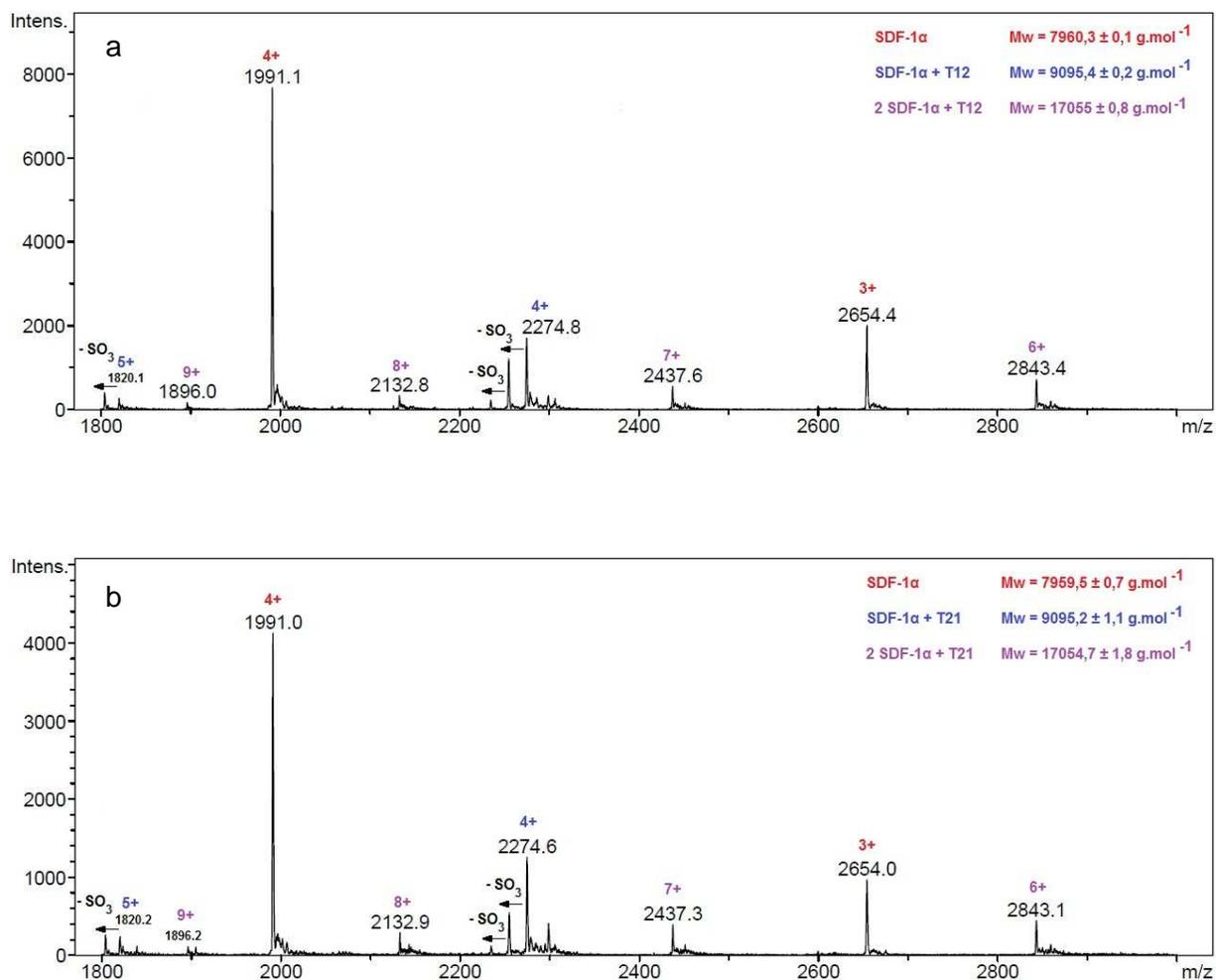


Figure 44 : Spectres de masse de SDF-1 α en présence de T12 et T21 obtenus par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μ m d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μ M (A) T12 et (B) T21 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s. Liquide d'appoint : méthanol 10% dans H₂O, 3 μ L.min⁻¹. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C.

La dernière série, très peu intense en vert, correspond aux états de charge 9+ (m/z 2924,0) et 10+ (m/z 2631,8) et de masse moléculaire 26307,5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Cette masse correspond au complexe non covalent de stoechiométrie 3/2. De façon remarquable, les ions correspondant au complexe 1/1 sont accompagnés de pics à plus faible rapport m/z distants de 80 unités de masse et donc caractéristiques de pertes de groupement sulfate. Une hypothèse est que ce complexe 1/1 provient de la dissociation en phase gazeuse du complexe 2/1, induisant une destabilisation de la structure et une perte des groupements sulfate qui ne sont plus protégés par une interaction avec la deuxième molécule de SDF-1 α .

Nous avons donc décidé d'analyser ces complexes par ACE-MS en modifiant uniquement le liquide d'appoint contenant 10% de méthanol par de l'acétate d'ammonium 20 mM (pH 5), dans le but de vérifier la spécificité des complexes obtenus. Le spectre de masse obtenu (Figure 43) présente des ions de plus faible intensité absolue mais globalement de même intensité relative. Les espèces détectées en présence de méthanol sont donc les mêmes qu'en présence d'acétate d'ammonium. Le choix du méthanol en faible quantité est donc adapté pour l'étude de ces complexes non covalents. En revanche, contrairement à ce qui avait été obtenu pour les complexes entre des tetrasaccharides naturels et SDF-1 α où seul le complexe 2 SDF-1 α / 1 tetrasaccharide hexasulfaté insaturé avait été détecté [476], l'interaction entre SDF-1 α et un tetrasaccharide hexasulfaté saturé et alkylé mène à plusieurs stoechiométries 1/1, 2/1 et 3/2 avec le complexe 2/1 majoritaire.

- **Complexes formés entre SDF-1 α et les tetrasaccharides T12 et T21**

Lorsque l'électrolyte de séparation contient le tetrasaccharide pentasulfaté T12, le spectre de masse obtenu (Figure 44a) présente deux autres séries d'ions en plus des ions à m/z 1991,1 (état de charge 4+) et m/z 2654,4 (3+) caractéristiques de SDF-1 α . La première série en bleu présente deux ions aux états de charge 4+ et 5+ correspondant respectivement aux rapports m/z 2274,8 et 1820,1. La masse moléculaire déterminée à $9095,4 \pm 0,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ correspond à un complexe non covalent formé par une protéine SDF-1 α et une molécule T12 ($M_{\text{théorique}} = 1134 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). La seconde série en violet, constituée par les ions de rapport m/z 2843,4 ; 2437,6 ; 2132,8 et 1896,0 correspondant respectivement aux états de charge 6+ à 9+, conduit à une masse moléculaire de $17055 \pm 0,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Cette masse correspond à un complexe non covalent de stoechiométrie 2/1. L'inversion des disaccharides 1 et 2 dans la structure du tetrasaccharide T12, donnant T21, conduit à un spectre de masse identique à celui de T12 (Figure 44b).

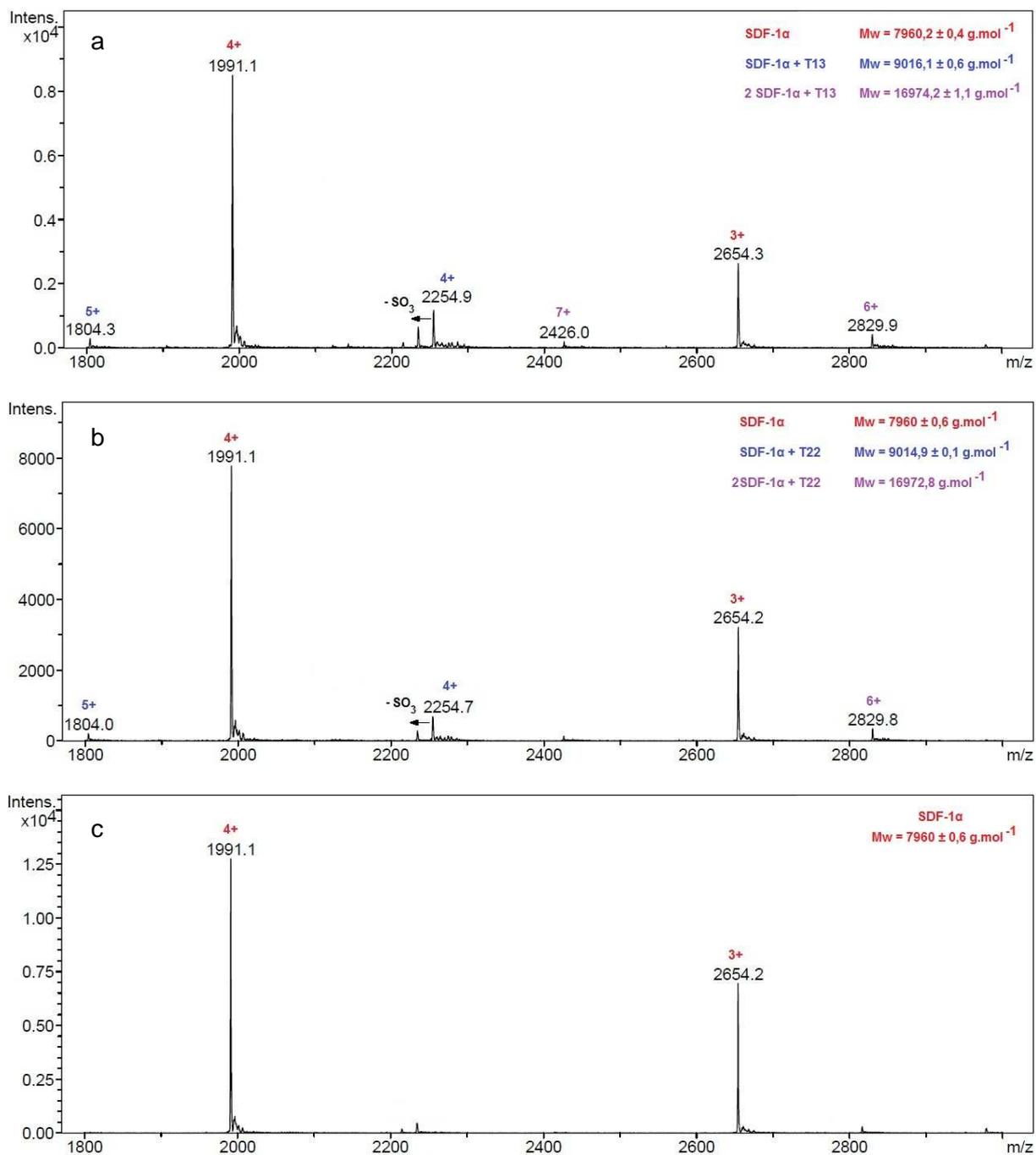


Figure 45 : Spectres de masse de SDF-1α en présence d'oligosaccharides obtenus par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 µm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM contenant 3 µM de (A) T13 ; (B) T22 et (C) T23, pH 6,5 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s. Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 µL.min⁻¹. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C.

Les deux spectres de masse identiques obtenus laissent penser que le changement dans la structure du tetrasaccharide pentasulfaté n'a aucun impact sur la stœchiométrie des complexes non covalents détectés par MS. Seul le nombre de groupements sulfate semble être impliqué. Contrairement à T11, la présence d'un tetrasaccharide pentasulfaté ne permet pas d'obtenir une stœchiométrie supérieure à 2/1. Tout comme le spectre de masse en présence de T11, l'espèce majoritairement représentée est de stœchiométrie 2/1. Les ions correspondant au complexe 1/1 sont également accompagnés de pics à plus faible rapport m/z distant de 80 unités de masse et donc caractéristiques de pertes de groupements sulfate.

- **Complexes formés entre SDF-1 α et les tetrasaccharides T13 et T22**

L'ajout du tetrasaccharide tetrasulfaté T13 dans le tampon de séparation conduit au spectre de masse obtenu par ACE-MS présenté dans la Figure 45a. Deux séries d'ions en plus des ions caractéristiques de SDF-1 α ont été identifiées. La première série en bleu est composée par les ions de rapport m/z 2254,9 (4+) et 1804,3 (5+). La masse moléculaire déterminée à $9014,9 \pm 0,1 \text{ g.mol}^{-1}$ correspond au complexe non covalent formé par une protéine SDF-1 α et une molécule T13 ($M_{\text{théorique}} = 1054 \text{ g.mol}^{-1}$). La seconde série en violet ne contient que deux ions, contrairement aux autres spectres de masse en présence de T11, T12 ou T21. Les ions de cette série de rapport m/z 2829,9 (6+) et 2426,0 (7+) conduisent à une masse moléculaire de $16974,2 \pm 1,1 \text{ g.mol}^{-1}$. Le complexe non covalent formé est de stœchiométrie 2/1. La présence du tetrasaccharide T22, de même formule brute que T13, conduit à un spectre de masse identique à celui de T13 (Figure 45b), ce qui amène encore à penser que le changement de position des groupements sulfate dans la structure du tetrasaccharide n'a pas d'influence sur la stœchiométrie des complexes détectés par MS et que seul le degré de sulfatation est important. La faible intensité des ions obtenus pour le complexe 1/1 laisse uniquement apparaître une perte de groupement sulfate. Cette observation amène une nouvelle fois à émettre l'hypothèse que ces ions proviendraient de la dissociation en phase gazeuse du complexe 2/1.

- **Complexes formés entre SDF-1 α et le tetrasaccharide T23**

La présence du tetrasaccharide trisulfaté T23 conduit au spectre de masse présenté dans la Figure 45c. Seuls les ions caractéristiques de SDF-1 α sont détectés : m/z 2654,2 (3+) et 1991,1 (4+). Aucun complexe n'est formé entre la protéine SDF-1 α et le tetrasaccharide T23.

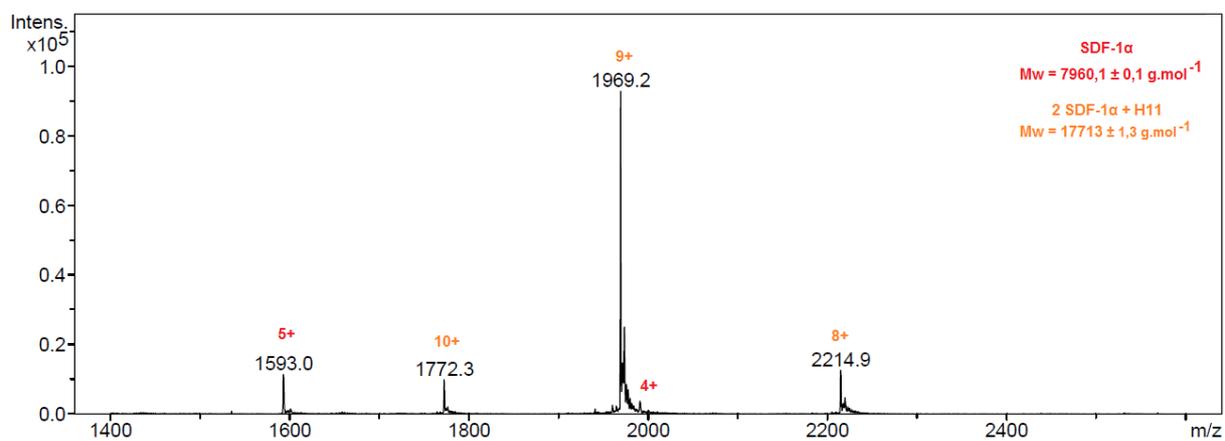


Figure 46 : Spectre de masse de SDF-1 α en présence de H11 obtenu par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μ m d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μ M de H11 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s.

Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 μ L.min⁻¹. Masse cible 2200 m/z, gamme de masse 1400-2600 m/z.

Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C.

La présence de seulement trois groupements sulfate dans la structure du tetrasaccharide n'est donc pas suffisant pour la formation et la détection de complexes. Ce résultat est confirmé par le fait qu'aucun K_d n'a pu être déterminé puisque les mobilités électrophorétiques en ACE n'ont pas révélées une interaction.

- **Oligosaccharide H11**

La présence de l'hexasaccharide nonasulfaté H11 (Figure 32) dans l'électrolyte de séparation conduit au spectre de masse présenté dans la Figure 46. Une seule série d'ions en orange est détectée en plus des ions caractéristiques de SDF-1 α . Les ions de rapport m/z 2214,9 ; 1969,2 et 1772,3 avec des états de charge respectifs 8+ à 10+ conduisent à une masse moléculaire de $17713 \pm 1,3 \text{ g.mol}^{-1}$. Cette masse correspond à un complexe non covalent formé par deux protéines SDF-1 α et une molécule H11 ($M_{\text{théorique}} = 1791 \text{ g.mol}^{-1}$).

Contrairement aux tetrasaccharides, aucun complexe de stœchiométrie 1/1 n'est observé. De même, l'intensité des ions correspondant à SDF-1 α est inférieure à celle des ions du complexe 2/1, ce qui n'était pas le cas avec les tetrasaccharides.

III.3.3 Discussion générale

Le couplage ACE-MS nous a permis de mettre en évidence la formation de complexes entre la chimiokine SDF-1 α et des oligosaccharides sulfatés de synthèse. L'objectif principal était de savoir si la présence/absence de certains groupements sulfate le long de la séquence de l'oligosaccharide favoriserait ou non la formation d'oligomères, et si oui, quelle en était la stœchiométrie.

Le tetrasaccharide hexasulfaté T11 a conduit aux stœchiométries de complexes 2/1 majoritaire, 1/1 et 3/2 (SDF-1 α /T11). Ces résultats mettent en évidence la dimérisation de la chimiokine SDF-1 α conformément aux précédents résultats menés au laboratoire [447]. En effet, les ions du complexe 2/1 sont majoritairement représentés dans le spectre de masse, suivis par les ions du 1/1 et du 3/2. Cependant, on peut s'interroger sur la spécificité (ou non) des formes 1/1 et 3/2, puisque par exemple on observe pour 1/1 une perte de groupements sulfate. Les pics électrophorétiques mal définis obtenus en présence de T11 lors de la détermination de la constante de dissociation $K_{d_{T11}}$ avaient conduit à l'hypothèse qu'ils devaient être dus à la présence de plusieurs stœchiométries de complexes SDF-1 α /T11. Le

couplage ACE-MS a donc permis de confirmer cette hypothèse par la présence des stœchiométries 1/1, 2/1 et 3/2.

La présence des tetrasaccharides pentasulfatés T12 ou T21 dans le capillaire de séparation conduit à des spectres de masse identiques. La différence dans la structure des oligosaccharides semble ne pas être impliquée dans la stœchiométrie des complexes. On retrouve la dimérisation de SDF-1 α avec une majorité d'ions correspondant à la forme 2/1 puis à la forme 1/1, qui présente également des pertes de groupements sulfate. Si l'on compare à T11, seule l'espèce 3/2 n'est plus présente et l'intensité des ions de 2/1 et 1/1 est plus faible pour T12 et T21. A ce niveau, le changement de position des groupements sulfate ne semble pas intervenir sur la stœchiométrie des complexes détectés par MS. Seul le nombre total de groupements semble jouer un rôle sur la forme de ces complexes. Il reste étonnant que les spectres de masse soient identiques si l'on se réfère aux constantes de dissociation mesurées (Tableau 23) pour les deux tetrasaccharides T12 et T21. De même, on pourrait s'attendre à ce que les stœchiométries pour les complexes SDF-1 α /T11 et SDF-1 α /T12 soient les mêmes puisque le $K_{d_{T12}}$ est quasiment identique à celui de T11. Cependant, cela confirme une nouvelle fois notre hypothèse sur la seule implication du nombre de groupements sulfate dans l'interaction SDF-1 α /oligosaccharide de synthèse, en ce qui concerne leur stœchiométrie, déterminée en phase gazeuse.

De la même façon, les tetrasaccharides tetrasulfatés T13 et T22 conduisent à des spectres de masse similaires, avec les ions de l'espèce 1/1 majoritaires devant ceux de l'espèce 2/1. On retrouve également la perte de groupements sulfate pour l'espèce 1/1 et l'intensité des ions pour les deux espèces est largement plus faible par rapport aux spectres en présence des autres tetrasaccharides. La différence de position des groupements sulfate n'est, encore une fois, pas impliquée dans la stœchiométrie puisque l'on retrouve les mêmes formes que pour les tetrasaccharides T12 et T21, mais avec des intensités plus faibles.

L'hexasaccharide nonasulfaté de synthèse H11 conduit à un spectre de masse où l'unique espèce complexée est de stœchiométrie 2/1. L'augmentation du nombre de groupements sulfate, liée à l'augmentation de la taille de l'oligosaccharide, conduit également à la dimérisation de SDF-1 α . La présence d'une seule stœchiométrie révèle que l'interaction SDF-1 α /H11 est sûrement plus spécifique et/ou plus stable qu'avec les tetrasaccharides. Cela est confirmé par la constante de dissociation $K_{d_{H11}}$ qui est environ 13 fois plus faible que pour T11, ce qui indique que l'interaction SDF-1 α /H11 est plus forte.

Ces données peuvent également apporter des informations sur l'éventuelle non spécificité des complexes de stœchiométrie 1/1 et 3/2 observés en présence de T11. Une dissociation en source pourrait être une explication pour le complexe 1/1 issu du complexe

2/1. Le complexe 3/2, n'étant pas retrouvé pour un autre oligosaccharide, pourrait être dû à une association non spécifique des complexes 1/1 et 2/1. Il se peut que ce complexe existe pour les autres oligosaccharides, mais ne peut être observé à cause d'une intensité très faible.

Les complexes formés par ACE-MS sont en accord avec les précédents travaux menés au laboratoire [476]. En effet, la présence d'un tetrasaccharide ou d'un hexasaccharide d'énoxaparine conduisait au complexe non covalent de stœchiométrie 2/1 et la présence d'un pentasaccharide de fucoïdane permettait la détection des stœchiométries 1/1 et 2/1. Cette dimérisation est en accord avec la caractérisation du complexe 2/1 par RMN [254].

Il reste étonnant que le changement de position des groupements sulfate n'ait pas d'influence sur la stœchiométrie des complexes détectés. Cependant cette observation peut être justifiée par la technique d'analyse des complexes en phase gazeuse. Les interactions électrostatiques sont renforcées, alors que les autres interactions liées au solvant sont diminuées. L'interaction SDF-1 α /oligosaccharide est également due à la structure tridimensionnelle du complexe qui est maintenue par ces différentes interactions.

On peut également se demander si la présence d'une queue propyle au niveau de l'extrémité réductrice des oligosaccharides déstabilise le complexe en solution et/ou en phase gazeuse.

III.4 Conclusion et perspectives

Le couplage entre l'électrophorèse capillaire, la spectrométrie de masse et la synthèse d'oligosaccharides sulfatés d'héparine nous a permis pour la première fois d'apporter des données importantes sur l'interaction SDF-1 α /oligosaccharides. La détermination des constantes de dissociation a révélé que la position des groupements sulfate, le long de la structure de l'oligosaccharide, était un élément important pour l'interaction. De plus, l'ACE-MS nous a indiqué que la stœchiométrie des complexes était liée au nombre de groupements sulfate dans la structure de l'oligosaccharide.

Ces résultats conduisent à de nouvelles perspectives quant à l'interaction de la chimiokine SDF-1 α avec les GAGs. Dans le but d'aboutir à la structure idéale d'un GAG pour un mimétique, d'autres oligosaccharides devront être étudiés. La modification de la position

des groupements sulfate sur l'hexasaccharide pourrait être envisagée, ainsi que l'étude d'un oligosaccharide de plus grande taille (octasaccharide...). D'autres types d'oligosaccharides, n'appartenant pas à la famille des GAGs, pourraient également être envisagés comme le fucoïdane d'origine marine (algues brunes).

SDF-1 α interagit également avec son récepteur CXCR4 *via* sa liaison aux GAGs portés par les PGs au niveau de la surface cellulaire. La grande interrogation est de savoir quelle est la forme oligomérique de SDF-1 α lorsqu'elle interagit avec son récepteur. Il serait intéressant de tester dans un premier temps, par ACE et ACE-MS, l'interaction entre SDF-1 α et la partie N-terminale du récepteur CXCR4 (partie impliquée dans l'interaction). Ensuite l'ajout d'un GAG sulfaté en plus de la partie N-terminale de CXCR4 pourrait également être étudié afin d'obtenir des informations sur l'oligomérisation de la chimiokine SDF-1 α .

A l'heure actuelle, le verrou majeur est la faible disponibilité des oligosaccharides synthétiques. La majorité des oligosaccharides provient de dépolymérisation enzymatique, rendant les analyses beaucoup plus complexes. Cependant, le couplage entre l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse est un atout quant à l'étude de ces mélanges. De plus, les progrès réalisés dans le domaine de la chimie de synthèse des oligosaccharides sulfatés sont également un atout pour l'étude des interactions protéines/GAG.

**CHAPITRE 4 : INTERACTION MCP-1 /
OLIGOSACCHARIDES D'HEPARINE DE
SYNTHESE**

IV.1 Introduction

Le chapitre précédent nous a permis d'évaluer le rôle de la position et du nombre de groupements sulfates, portés par des oligosaccharides de synthèse de type héparine, sur l'oligomérisation de la chimiokine SDF-1 α . Dans le but de déterminer si la structure des oligosaccharides a le même effet sur une autre chimiokine, MCP-1 (I.B.3.4.2), appartenant à la famille CCL, la même étude a été effectuée. La chimiokine MCP-1 intervient lors de réactions inflammatoires et dans certaines pathologies du système nerveux central. Le choix de cette chimiokine a été guidé par la nécessité d'apporter de nouvelles informations sur l'oligomérisation de cette protéine, déjà étudiée au laboratoire [476].

Tout comme SDF-1 α , MCP-1 interagit avec les GAGs. Cependant, MCP-1 présente un niveau d'oligomérisation supérieur au complexe 2/1 de la chimiokine SDF-1 α . En effet, des simulations par modélisation moléculaire montrent que le dimère MCP-1/héparine est de stœchiométrie 2/2 [217]. Cette stœchiométrie a été confirmée par les précédents travaux menés au laboratoire en présence de tetrasaccharide et d'hexasaccharide d'enoxyparine et de pentasaccharide de fucane [476]. Les stœchiométries 1/1 et 2/1 ont également été observées. Cependant, il semblerait que la chimiokine soit en mesure de former un tetramère en présence de GAGs [366], mais cette structure n'a pas encore été observée par spectrométrie de masse. La détection du tetramère reste donc un challenge analytique.

La chimiokine MCP-1 existe elle aussi sous la forme d'un équilibre monomère-dimère en solution [217, 353, 358, 359]. Contrairement à SDF-1 α , la chimiokine MCP-1 a été détectée sous ses formes monomérique et dimérique par spectrométrie de masse ESI [357, 358], mais le dimère n'est pas très stable en phase gazeuse [358].

Afin de déterminer quels seront les effets de la structure des oligosaccharides sur la liaison MCP-1/GAG ainsi que les différences par rapport à SDF-1 α , nous avons déterminé les constantes de dissociations par ACE.

De plus, le couplage CE-MS a été mis en œuvre pour étudier la forme (monomérique ou oligomérique) de MCP-1 en solution dans nos conditions. Comme pour SDF-1 α , nous avons étudié la stœchiométrie des complexes formés en présence d'oligosaccharides de synthèse dans le but de mettre en évidence la présence de dimères et/ou d'oligomères d'ordre supérieur.

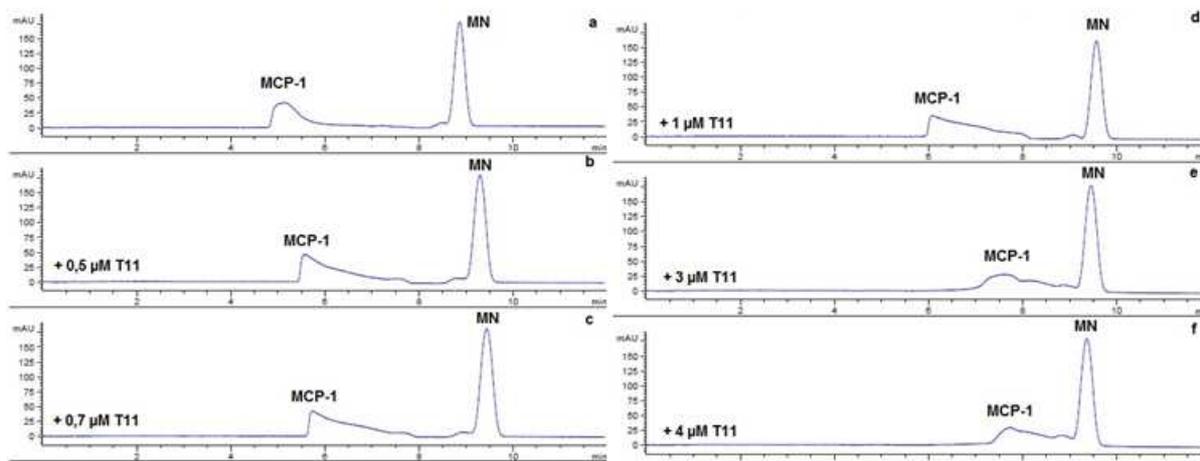


Figure 47 : Electrophorégrammes de MCP-1 en présence de T11 en concentration croissante obtenus par ACE.

(a) 0 μM ; (b) 0,5 μM ; (c) 0,7 μM ; (d) 1 μM ; (e) 3 μM et (f) 4 μM de T11. Capillaire HPC, 50 μm d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μM ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
[T11] μM	série 1	série 2	série 3
0	15,6	15,6	15,6
0,5	13,0	13,0	13,0
0,7	12,3	12,4	12,4
1	10,8	10,9	11,5
3	4,7	4,7	6,0
4	4,1	4,4	4,2

Tableau 24 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T11.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	4,65E-06	4,32E-06	4,49E-06
Série 2	4,63E-06	4,20E-06	4,34E-06
Série 3	4,39E-06	4,51E-06	3,40E-06
Moyenne par méthode	4,56E-06	4,35E-06	4,08E-06
Moyenne des 3 méthodes Kd T11	4,33 \pm 0,24 μM		

Tableau 25 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T11 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

IV.2 Etude de l'interaction MCP-1/tetrasaccharides de synthèse par ACE

IV.2.1 Analyse de MCP-1 par CE

A l'instar de SDF-1 α , la chimiokine MCP-1 est une protéine basique (pI 9,74), et donc chargée positivement au pH de l'analyse. Les mêmes conditions électrophorétiques décrites dans le chapitre précédent (III.2.1) ont été utilisées afin d'éviter l'adsorption de la protéine sur les parois internes du capillaire d'électrophorèse. Les électrophorégrammes obtenus après l'injection de la chimiokine MCP-1 (15 μ M) montrent un pic avant celui du marqueur neutre, correspondant à la protéine chargée positivement (Figure 47a). La mobilité électrophorétique, non mentionnée dans la littérature, de la protéine MCP-1 a été déterminée à environ $\mu_{ep, MCP-1} = 15.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$. La mobilité électrophorétique obtenue pour MCP-1 est plus faible que celle obtenue pour SDF-1 α ($22.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$). Cette différence est due à l'augmentation du temps de migration de la protéine qui s'explique par une diminution du rapport z/m. En effet, cette diminution est à la fois due à la charge globale positive de la protéine plus faible au pH de l'analyse (pI_{MCP-1} 9,74 contre pI_{SDF-1 α} 9,52), et à l'augmentation du poids moléculaire de la protéine ($M_{MCP-1} = 8680 \text{ g.mol}^{-1}$ contre $M_{SDF-1\alpha} = 7960 \text{ g.mol}^{-1}$).

IV.2.2 Rôle de la distribution des groupements sulfate dans l'interaction

- **Interaction MCP-1 / tetrasaccharide T11**

Dans le but de déterminer la constante de dissociation du complexe entre MCP-1 et le tetrasaccharide hexasulfaté T11, une gamme de concentration a été optimisée pour cet oligosaccharide : 0 – 0,5 – 0,7 – 1 – 3 – 4 μ M. En effet, la mobilité électrophorétique de la protéine sans oligosaccharide étant plus faible que pour SDF-1 α , il a fallu adapter la gamme 0 – 1 – 3 – 5 – 10 – 15 μ M pour ne pas obtenir des pics électrophorétiques trop proches, voire masqués par le marqueur neutre, et donc ininterprétables. Trois séries de six points ont été réalisées. La Figure 47 présente les électrophorégrammes obtenus pour une série. Les deux autres séries sont regroupées dans l'Annexe 12. Les mobilités électrophorétiques déterminées (Tableau 24) diminuent progressivement, mettant en évidence une interaction entre MCP-1 et T11.

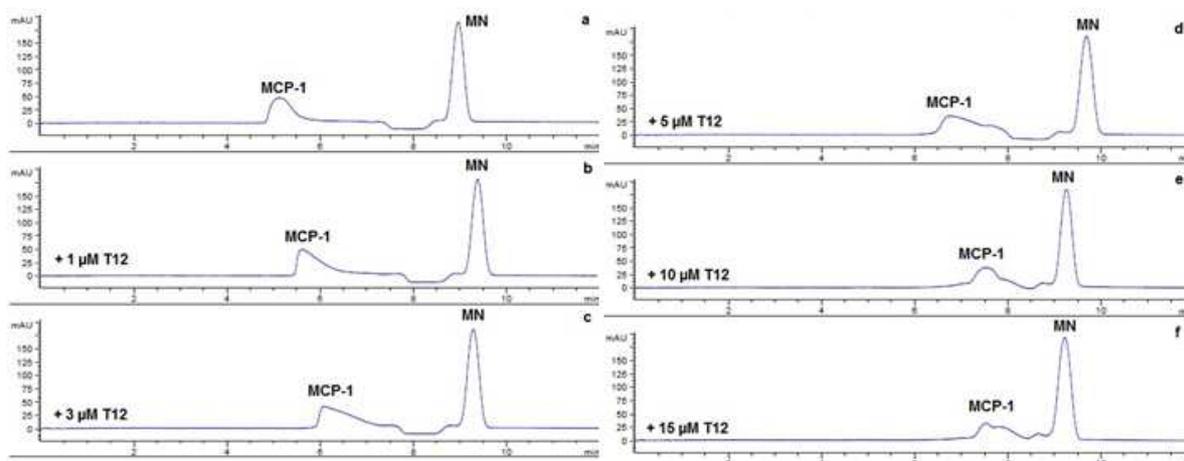


Figure 48 : Electrophorégrammes de MCP-1 en présence de T12 en concentration croissante obtenus par ACE.

(a) 0 μM ; (b) 1 μM ; (c) 3 μM ; (d) 5 μM ; (e) 10 μM et (f) 15 μM de T12. Capillaire HPC, 50 μm d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μM ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

[T12] μM	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
	série 1	série 2	série 3
0	15,0	15,3	15,0
1	13,0	13,2	12,9
3	10,2	10,5	10,1
5	8,2	8,2	7,7
10	4,5	4,7	4,8
15	4,4	4,4	4,2

Tableau 26 : Mobilités électrophorétiques en présence de T12.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	6,67E-06	6,41E-06	6,89E-06
Série 2	6,98E-06	6,68E-06	7,02E-06
Série 3	6,99E-06	6,28E-06	6,97E-06
Moyenne par méthode	6,88E-06	6,46E-06	6,96E-06
Moyenne des 3 méthodes Kd T12	6,77 \pm 0,27 μM		

Tableau 27 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T12 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

La linéarisation des résultats (Annexe 13) a conduit à la détermination de la constante de dissociation $K_{d_{T11}}$ pour l'interaction MCP-1/T11 : **$4,33 \pm 0,24 \mu\text{M}$** (Tableau 25). Cette valeur est plus grande (environ 1,4 fois) que pour le $K_{d_{T11}}$ de SDF-1 (2,92 μM), ce qui traduit une plus faible interaction entre la chimiokine MCP-1 et le tetrasaccharide T11.

- **Interaction MCP-1 / tetrasaccharide T12**

La gamme de concentration 0 – 1 – 3 – 5 – 10 – 15 μM a permis de déterminer la constante de dissociation du complexe MCP-1/T12. Trois séries ont été réalisées, et la Figure 48 présente les électrophorogrammes d'une des séries. Les deux autres séries sont regroupées dans l'Annexe 14. Si l'on compare l'allure des pics électrophorétiques en présence de T11 et T12 pour MCP-1, on constate que pour T11 et T12 les pics sont mal définis, c'est-à-dire qu'ils sont plus élargis par rapport au pic de la protéine en absence d'oligosaccharide. Cela pourrait résulter de la coexistence de stœchiométries différentes pour T11 et T12, avec cependant moins d'espèces pour T12. L'hypothèse sera vérifiée ou non lors du couplage ACE-MS (IV.3.2).

Les mobilités électrophorétiques déterminées par ACE (Tableau 26) mettent également en évidence une interaction entre MCP-1 et T12. La linéarisation des résultats (Annexe 15), *via* les trois méthodes de linéarisation, a permis de déterminer le $K_{d_{T12}}$ à **$6,77 \pm 0,27 \mu\text{M}$** (Tableau 27).

La constante de dissociation obtenue pour l'interaction MCP-1/T12 est environ 1,5 fois plus grande que pour l'interaction MCP-1/T11. Cela traduit une plus faible interaction de MCP-1 avec T12 qu'avec T11. Il semblerait donc que l'absence du groupement 6-O-sulfate de la partie GlcNS réductrice semble diminuer la force d'interaction. Si l'on se base sur les motifs disaccharidiques, l'association d'un disaccharide majoritaire (1) et d'une des formes minoritaires (2) ne semble pas être une structure optimale pour une bonne interaction par rapport à T11, composé par deux disaccharides majoritaires. C'est une situation différente de SDF-1 α puisque il n'y avait pas de différence entre les K_d pour T11 et T12.

- **Interaction MCP-1 / tetrasaccharide T13**

Afin de tester l'effet du tetrasaccharide T13, associant un disaccharide majoritaire de l'héparine (1) et de l'autre disaccharide minoritaire (3), sur l'interaction avec MCP-1, nous avons utilisé la même gamme de concentration que pour T12.

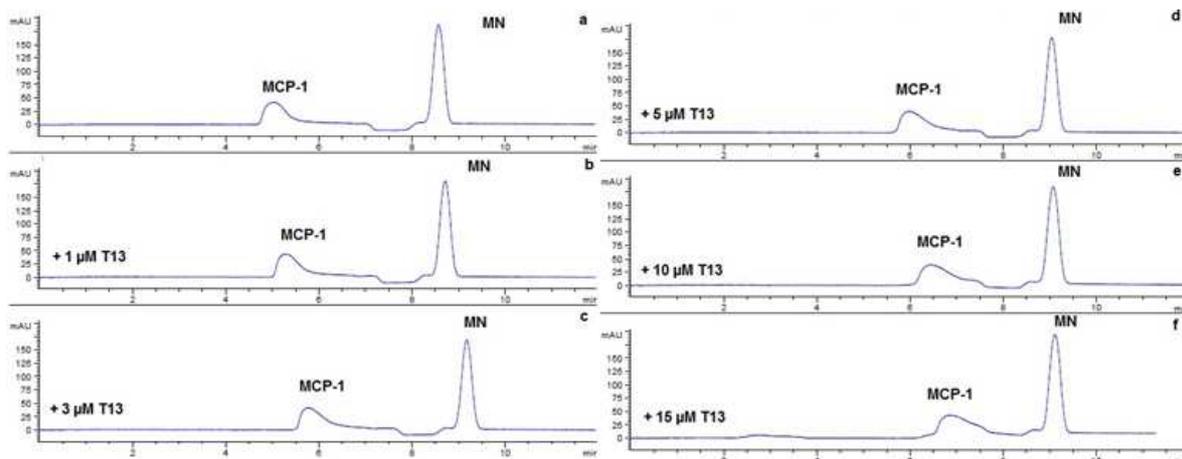


Figure 49 : Electrophorégrammes de MCP-1 en présence de T13 en concentration croissante obtenus par ACE.

(a) 0 μM ; (b) 1 μM ; (c) 3 μM ; (d) 5 μM ; (e) 10 μM et (f) 15 μM de T12. Capillaire HPC, 50 μm d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μM ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

[T13] μM	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
	série 1	série 2	série 3
0	14,8	15,2	15,3
1	13,5	13,8	13,8
3	11,6	12,0	12,0
5	10,2	10,5	10,3
10	8,0	8,3	8,0
15	6,5	7,1	7,1

Tableau 28 : Mobilités électrophorétiques en présence de T13.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	9,48E-06	9,76E-06	8,86E-06
Série 2	8,48E-06	8,59E-06	7,82E-06
Série 3	8,11E-06	8,01E-06	7,34E-06
Moyenne par méthode	8,69E-06	8,78E-06	8,01E-06
Moyenne des 3 méthodes Kd T13	8,49 \pm 0,42 μM		

Tableau 29 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T13 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

La Figure 49 présente les électrophorégrammes obtenus pour une série d'expériences, les deux autres sont regroupées dans l'Annexe 16. Comme le traduisent les mobilités électrophorétiques extraites des électrophorégrammes (Tableau 28), il existe une interaction entre MCP-1 et T13. La valeur des mobilités électrophorétiques révèle cependant une interaction encore plus faible qu'avec T12. La linéarisation des résultats (Annexe 17) confirme cette observation par le calcul du $K_{d_{T13}}$ à **$8,49 \pm 0,42 \mu\text{M}$** (Tableau 29).

L'allure des pics électrophorétiques en présence de T13 permet également d'émettre une hypothèse quant à la stœchiométrie du complexe, constituée vraisemblablement de moins de formes que pour T11 et T12. Le couplage ACE-MS permettra de vérifier ou non cette hypothèse (IV.3.2).

L'absence du groupement 2-O-sulfate au niveau de l'idoA du côté réducteur semble également affaiblir la liaison MCP-1/T13. Ce résultat met en évidence que le tetrasaccharide constitué par un disaccharide majoritaire et un disaccaride minoritaire de l'héparine ne permet pas la meilleure interaction.

- **Interaction MCP-1 / tetrasaccharide T21**

Le tetrasaccharide T21 est la construction inverse du tetrasaccharide T12, les deux disaccharides ont été inversés dans la structure dans le but de tester l'influence de la présence d'un disaccharide minoritaire (Tableau 2) d'héparine au niveau de l'extrémité non réductrice. La gamme de concentration utilisée est la même que pour T12 : 0 – 1 – 3 – 5 – 10 – 15 μM .

Les électrophorégrammes de la Figure 50 montrent également un décalage du pic de la protéine vers le marqueur neutre, traduisant ainsi une interaction entre MCP-1 et T21. Les deux autres séries sont présentées dans l'Annexe 18. La détermination des mobilités électrophorétiques (Tableau 30) apporte une précision sur l'interaction MCP-1/T21. En effet, comme pour T12, on remarque une diminution progressive des mobilités électrophorétiques. La linéarisation des résultats (Annexe 19) a permis de déterminer la constante de dissociation $K_{d_{T21}}$ pour l'interaction MCP-1/T21 à **$6,40 \pm 0,19 \mu\text{M}$** (Tableau 31). Cette valeur est quasiment identique à celle obtenue pour T12, ce qui montre que l'inversion des disaccharides n'a pas d'effet sur l'interaction entre MCP-1 et T12 ou T21. Cependant, comme pour T12, le $K_{d_{T21}}$ est supérieur à celui de T11, ce qui implique que le groupement 6-O-sulfate du côté non réducteur est également nécessaire à une meilleure interaction.

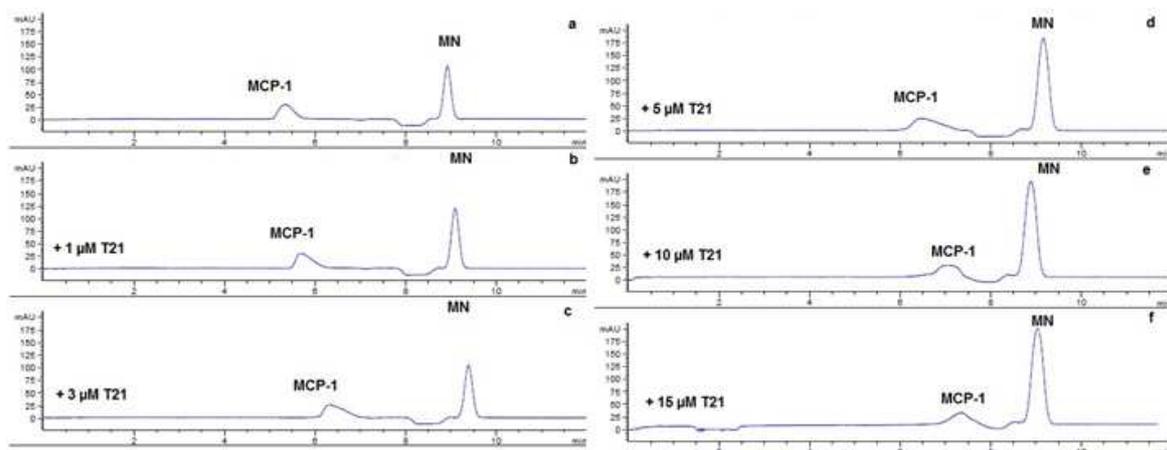


Figure 50 : Electrophorégrammes de MCP-1 en présence de T21 en concentration croissante obtenus par ACE.

(a) 0 μM ; (b) 1 μM ; (c) 3 μM ; (d) 5 μM ; (e) 10 μM et (f) 15 μM de T21. Capillaire HPC, 50 μm d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μM ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

[T21] μM	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
	série 1	série 2	série 3
0	13,6	16,0	16,0
1	12,0	13,7	13,4
3	9,4	10,7	10,9
5	8,0	8,4	8,7
10	5,1	5,9	6,0
15	4,5	4,7	4,6

Tableau 30 : Mobilités électrophorétiques en présence de T21.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	7,67E-06	7,01E-06	8,22E-06
Série 2	6,12E-06	5,74E-06	6,39E-06
Série 3	5,65E-06	5,82E-06	5,03E-06
Moyenne par méthode	6,48E-06	6,19E-06	6,54E-06
Moyenne des 3 méthodes Kd T21	6,40 ± 0,19 μM		

Tableau 31 : Détermination de la constante de dissociation en présence de T21 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

- **Interaction MCP-1 / tetrasaccharide T22 et T23**

Trois séries de 6 points, avec la gamme de concentration 0 – 1 – 3 – 5 – 10 – 15 μM , ont été réalisées. Les électrophorégrammes obtenus en présence de T22 sont présentés dans l'Annexe 20 et les mobilités électrophorétiques, déterminées d'après les électrophorégrammes, sont présentées dans le Tableau 32.

La présence de 2 disaccharides minoritaires dans le tetrasaccharide T22 ne permet pas d'observer une variation de la mobilité électrophorétique, et par conséquent, ne permet pas la détermination d'un K_d pour l'interaction MCP-1/T22, comme ce fut le cas avec la chimiokine SDF-1 α .

De même, les électrophorégrammes en présence de T23 sur un capillaire tapissé par le PEO (non présentés dans ce manuscrit) n'ont pas montré une variation des mobilités électrophorétiques. C'est pourquoi les manipulations n'ont pas été reconduites sur capillaire greffé par l'HPC.

Si l'on retire le groupement 6-O-sulfate du GlcNS du côté réducteur, aucune interaction n'est possible. Cela montre que la présence dans le tetrasaccharide d'au moins un motif majoritaire de l'héparine est nécessaire pour une interaction. L'association des deux motifs disaccharidiques minoritaires ne permet donc pas de réaliser une interaction avec MCP-1.

- **Interaction MCP-1 / hexasaccharide H11**

L'hexasaccharide nonasulfaté de synthèse a été introduit dans le capillaire d'électrophorèse selon la gamme de concentration suivante : 0 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1 μM . Comme pour SDF-1 α , la gamme de concentration 0 – 1 – 3 – 5 – 10 – 15 μM a été réduite pour éviter la présence de pics trop proches du marqueur neutre ou mal définis.

Trois séries de 6 points ont été réalisées (Annexe 21) et les mobilités électrophorétiques déterminées sont présentées dans le Tableau 33. La linéarisation des résultats (Annexe 22) a permis la détermination de la constante de dissociation $K_{d_{H11}}$ pour l'interaction MCP-1/H11 à **1,96 \pm 0,13 μM** (Tableau 34).

L'augmentation de la taille de l'oligosaccharide de synthèse (T11 \rightarrow H11) conduit à un K_d environ 2,2 fois plus faible que pour T11. L'interaction MCP-1 / H11 est certes renforcée, mais beaucoup moins que pour l'interaction SDF-1 α / H11 (III.2.2).

	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
[T22] μM	série 1	série 2	série 3
0	14,6	14,6	15,6
1	13,9	11,9	13,0
3	12,8	13,5	13,2
5	12,4	12,8	10,5
10	10,9	11,1	11,0
15	9,0	10,0	9,9

Tableau 32 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de T22.

	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
[H11] μM	série 1	série 2	série 3
0	14,6	14,6	14,6
0,2	14,0	14,0	13,8
0,4	12,3	12,8	12,6
0,6	10,8	11,5	11,2
0,8	8,4	9,5	9,3
1	6,6	7,4	7,3

Tableau 33 : Mobilités électrophorétiques obtenues en présence de H11.

	x-réciproque (M)	y-réciproque (M)	double-réciproque (M)
Série 1	2,35E-06	2,34E-06	2,25E-06
Série 2	1,73E-06	1,63E-06	1,39E-06
Série 3	2,11E-06	2,03E-06	1,77E-06
Moyenne par méthode	2,06E-06	2,00E-06	1,81E-06
Moyenne des 3 méthodes Kd H11	1,96 \pm 0,13 μM		

Tableau 34 : Détermination de la constante de dissociation en présence de H11 selon les méthodes de linéarisation x-, y- et double-réciproque.

IV.2.3 Conclusion

L'électrophorèse capillaire d'affinité nous a permis de déterminer la constante de dissociation pour différentes structures de tetrasaccharides de synthèse, ainsi que pour l'hexasaccharide. Le tetrasaccharide T11, conçu de façon à contenir deux disaccharides majoritaires de l'héparine, conduit à un K_d de 4,33 μM . La comparaison de ce K_d avec celui obtenu pour SDF-1 α (2,92 μM) met en évidence une interaction environ 1,5 fois moins forte que pour la chimiokine MCP-1. Le tetrasaccharide T12 (disaccharide majoritaire + disaccharide minoritaire) conduit à un K_d de 6,77 μM montrant une diminution de la force d'interaction MCP-1/T12. L'absence du groupement 6-O-sulfate du GlcNS réducteur modifie donc la force de l'interaction, ce qui n'était pas le cas avec SDF-1 α . De même, la présence de l'autre disaccharide minoritaire du côté réducteur (T13) conduit à un K_d de 8,49 μM qui montre l'importance du groupement 2-O-sulfate de l'IdoA réducteur dans l'interaction avec MCP-1. Nous pouvons donc conclure dans un premier temps sur l'importance d'avoir un disaccharide majoritaire de l'héparine du côté non réducteur de l'oligosaccharide afin d'avoir la meilleure interaction possible. Lorsque le disaccharide majoritaire est placé du côté réducteur du tetrasaccharide (T21), il en résulte un K_d de 6,40 μM . Ce K_d , quasiment identique à celui pour T12, met en évidence la diminution de l'interaction MCP-1/T21 de la même façon que pour T12. La présence d'un disaccharide minoritaire de l'héparine du côté non réducteur, et donc l'absence du groupement 6-O-sulfate du GlcNS non réducteur, provoque également une augmentation de la constante de dissociation, et donc une diminution de l'interaction. La présence de deux disaccharides minoritaires dans la structure du tetrasaccharide (T22 et T23) ne permet plus l'interaction avec la chimiokine MCP-1. Enfin, l'augmentation de la taille de l'oligosaccharide de T11 à H11 met en évidence, tout comme pour SDF1 α , une diminution de la constante de dissociation, donc une plus forte interaction.

L'ACE a permis de déterminer pour la première fois des constantes de dissociation pour des tetrasaccharides et un hexasaccharide de synthèse de type héparine en interaction avec MCP-1 (Tableau 35). Les K_d déterminés (gamme micromolaire) sont en accord avec les données de la littérature, puisqu'en présence d'héparine [^3H] (6000 – 20000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) le K_d est de 1,5 μM [364] (filtration sur membrane). Comme pour SDF-1 α , la taille de l'oligosaccharide semble être importante pour l'interaction.

Oligosaccharide	Degré de sulfatation	Kd (μM)
H11	9	1,96
T11	6	4,33
T12	5	6,77
T13	4	8,49
T21	5	6,40

Tableau 35 : Tableau récapitulatif des constantes de dissociation déterminées pour chaque oligosaccharide.

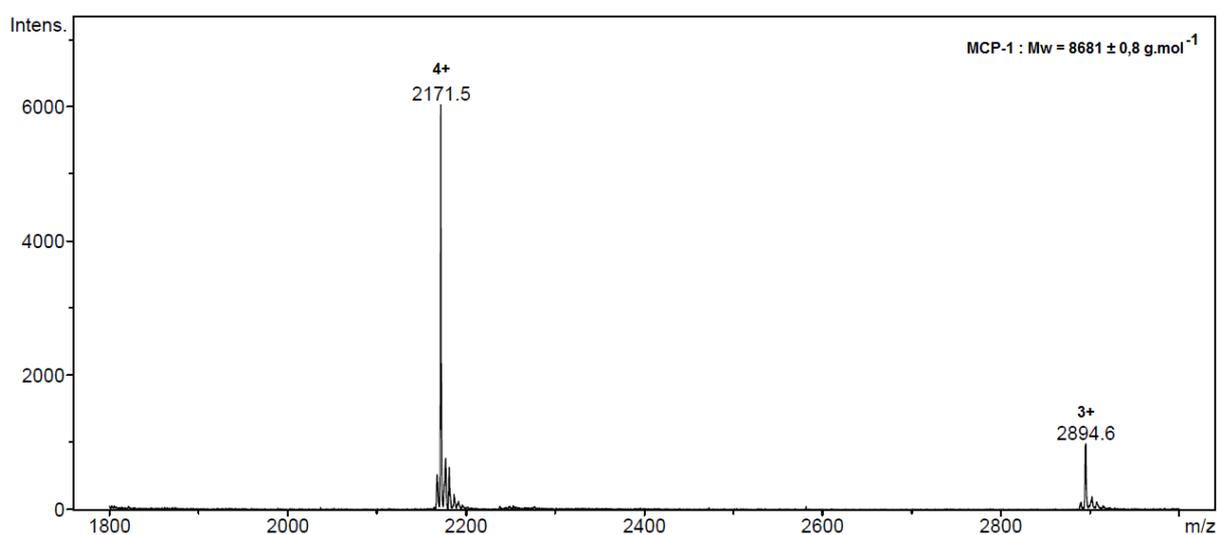


Figure 51 : Spectre de masse de MCP-1 obtenus par CE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s. Liquide d'appoint : méthanol 10% dans H₂O, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800 – 300 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L $\cdot\text{min}^{-1}$ à 150°C. Masse cible (Target Mass) : commande du logiciel esquire control (Bruker) permettant de stabiliser les ions dans une gamme m/z donnée.

IV.3 Etude de l'oligomérisation de MCP-1 en présence d'oligosaccharides de synthèse par ACE-MS

Les expériences d'électrophorèse capillaire d'affinité ont permis la détermination des constantes de dissociation pour divers oligosaccharides sulfatés de synthèse. Construits sur le modèle de l'héparine naturelle, les oligosaccharides, à travers leur interaction avec MCP-1, ont conduit à se poser des questions quant à la stœchiométrie des complexes formés dans le capillaire d'électrophorèse. Des simulations par modélisation moléculaire, confirmés par les précédents travaux au laboratoire [476], montrent que le dimère MCP-1 / héparine est de stœchiométrie 2/2 [217]. La première interrogation, basée sur la largeur des pics électrophorétiques est de savoir si des oligomères d'ordre supérieur au complexe 2/2 sont formés. Comme pour SDF-1 α , nous pouvons également nous demander si la modification des positions des groupements sulfate dans la structure de l'oligosaccharide aura un effet sur la dimérisation de la chimiokine MCP-1. Dans le but de répondre à ces questions, les conditions de couplage décrites dans le chapitre précédent ont également été reproduites pour l'étude de l'interaction MCP-1/oligosaccharide de synthèse.

IV.3.1 Détection de MCP-1 par CE-MS

Le spectre de masse ESI (mode positif) de la chimiokine MCP-1 a été obtenu par CE-MS à l'aide d'un capillaire d'électrophorèse greffé par de l'HPC. Les états de charge (3+ et 4+) observés dans la gamme de masse 1800 – 3000 m/z permettent de calculer une masse moléculaire moyenne $M = 8681 \pm 0,8 \text{ g.mol}^{-1}$ (Figure 51) qui est en accord avec la masse théorique de la chimiokine MCP-1, $M = 8685 \text{ g.mol}^{-1}$, soit un écart de 4 g.mol^{-1} (environ 500 ppm). Les études d'équilibre de sédimentation, présentées dans la littérature sur la chimiokine MCP-1, ont montré qu'il existe un équilibre monomère/dimère pour MCP-1 seule en solution (K_d de l'ordre du μM) [352-354]. Le dimère a également été observé par spectrométrie de masse nESI IMS-MS [358]. Cependant, ce dimère n'est pas très stable en phase gazeuse [358]. Nos conditions expérimentales permettent de détecter uniquement le monomère de la chimiokine MCP-1.

Les complexes formés par ACE-MS seront donc uniquement dus, s'ils se forment, à la présence de l'oligosaccharide. Il reste à savoir si la présence d'un oligosaccharide sulfaté sera suffisante pour promouvoir la dimérisation de la chimiokine MCP-1.

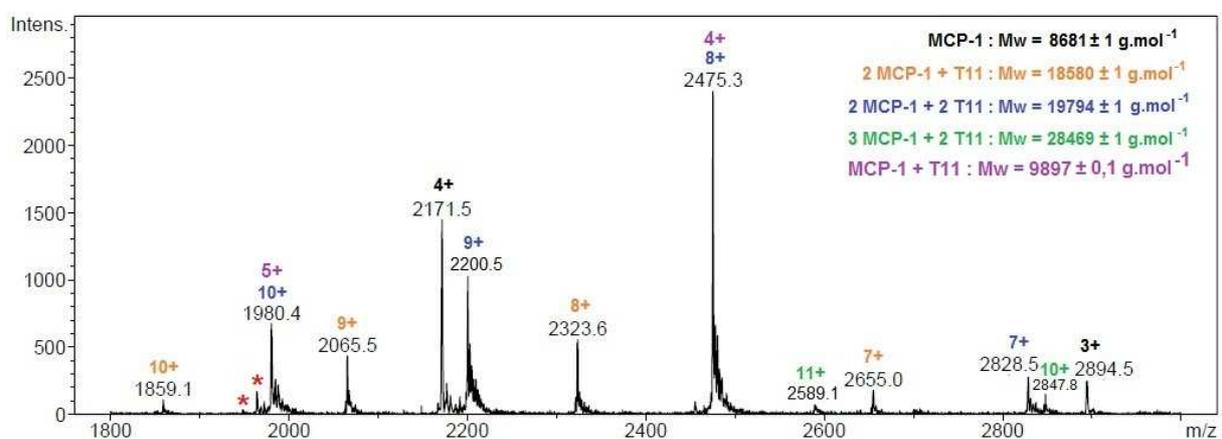


Figure 52 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T11 obtenus par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μM de T11; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s .
 Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z.
 Nébulisation 5 psi, séchage 3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ à 150°C.

IV.3.2 Stœchiométrie des complexes mesurée par ACE-MS

Comme pour SDF-1 α , les oligosaccharides de synthèse ont été introduits dans l'électrolyte de séparation à la concentration de 3 μ M. Le liquide additionnel est un mélange eau/méthanol (90 : 10, v/v).

- **Complexes formés entre MCP-1 et le tetrasaccharide T11**

La présence du tetrasaccharide hexasulfaté de synthèse T11 dans l'électrolyte de séparation conduit à la formation (Figure 52) de quatre nouvelles espèces de masse moléculaire plus élevée que celle de MCP-1. En plus des ions caractéristiques du monomère de MCP-1 à m/z 2171,5 (4+) et 2894,5 (3+), on détecte une première série (en bleu) d'ions assez intense. Les états de charge 7+ à 10+ correspondant respectivement aux rapports masse sur charge m/z 2828,5 ; 2475,3 ; 2200,5 et 1980,4 permettent de calculer une masse moléculaire de 19794 ± 1 $g \cdot mol^{-1}$. Cette masse correspond à la masse d'un complexe non covalent formé de deux protéines MCP-1 et de deux molécules de T11 ($M = 1214$ $g \cdot mol^{-1}$).

Une seconde série en orange apparaît à m/z 1859,1 (10+) ; 2065,5 (9+) ; 2323,6 (8+) et 2655,0 (7+) et correspond à une masse moléculaire de 18580 ± 1 $g \cdot mol^{-1}$, soit un complexe non covalent de stœchiométrie 2/1. La troisième série en vert est très peu intense. Elle regroupe les deux ions de rapports m/z 2589,1 (11+) et 2847,8 (10+) correspondant à un complexe non covalent de stœchiométrie 3/2.

La dernière série en violet présente deux ions à m/z 1980,4 (5+) et 2474,3 (4+) correspondant au complexe de stœchiométrie 1/1. Les deux ions se retrouvent confondus avec les ions 10+ et 9+ du complexe 2/2. Cependant, le pic 5+ est accompagné de pics à plus faible m/z distants de 80 unités de masse (astérisques rouges) et donc caractéristiques de pertes de groupement sulfate. Ces pertes ne peuvent être attribuées à l'ion 10+ car cela reviendrait à perdre à la fois deux groupements sulfate, et cela est impossible.

Tout comme SDF-1 α , les conditions d'ionisation douce (acétate d'ammonium pH 5, 20 mM) ne permettent pas d'obtenir un spectre montrant des complexes de stœchiométrie plus élevée que 3/2 ou bien ils n'existent pas. On peut supposer que le complexe 2/2 est moins stable en phase gazeuse, ce qui expliquerait la présence du complexe de stœchiométrie 2/1. De plus la stœchiométrie 3/2 n'avait encore jamais été observée. Elle pourrait correspondre à la déstabilisation en phase gazeuse de complexes de stœchiométrie plus élevée.

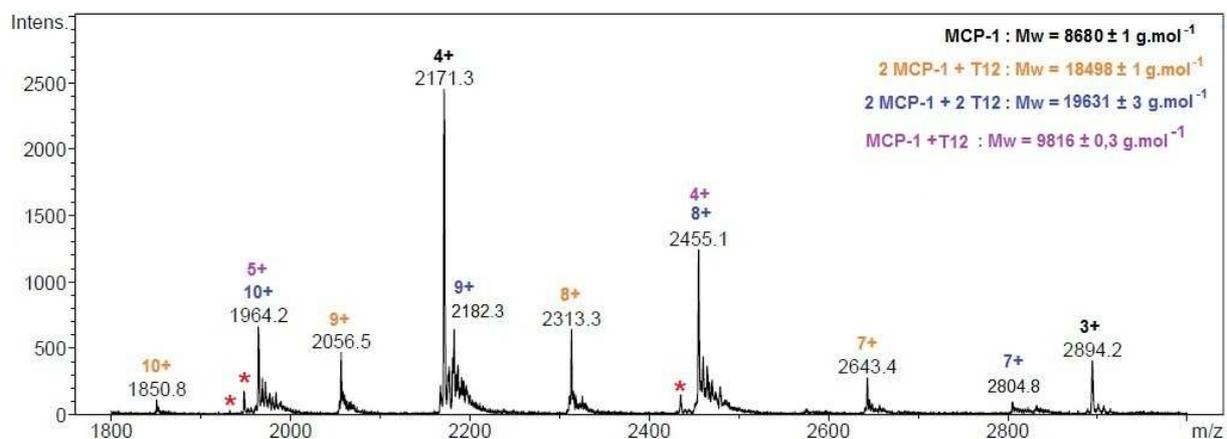


Figure 53 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T12 obtenus par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μM de T12; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s .

Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z.

Nébulisation 5 psi, séchage 3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ à 150°C.

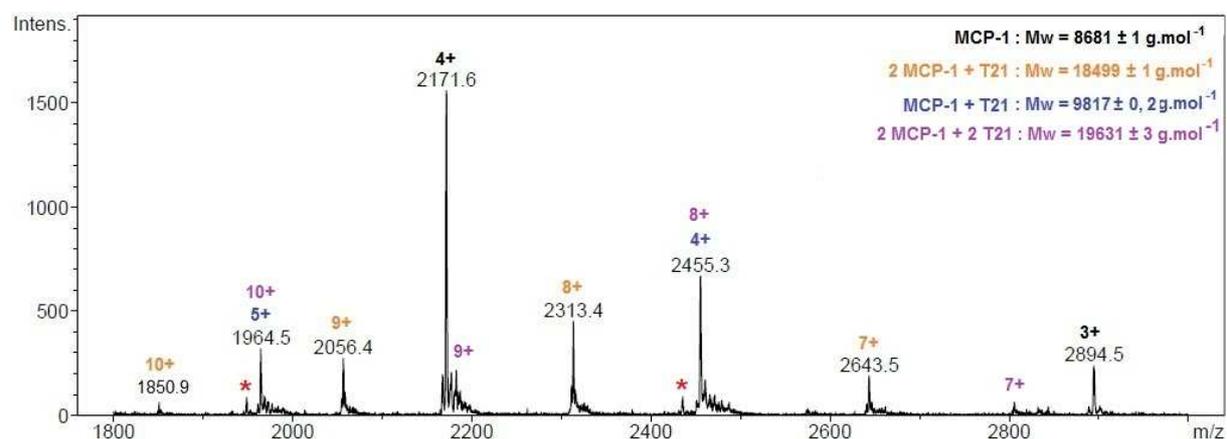


Figure 54 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T21 obtenus par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μM de T21; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s .

Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z.

Nébulisation 5 psi, séchage 3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ à 150°C.

- **Complexes formés entre MCP-1 et le tetrasaccharide T12 et T21**

La présence du tetrasaccharide T12 dans l'électrolyte de séparation conduit au spectre de masse présenté dans la Figure 53. Trois séries, en plus des ions caractéristiques du monomère de MCP-1 (m/z 2171,3 et m/z 2894,2) sont observées. La première série la plus intense en bleu est constituée par les ions aux états de charge 7+ (m/z 2804,8) ; 8+ (m/z 2455,1) ; 9+ (m/z 2182,3) et 10+ (m/z 1964,2). La masse moléculaire calculée d'après cette série d'ions est de $19631 \pm 3 \text{ g.mol}^{-1}$. Elle correspond au complexe non covalent de stœchiométrie 2/2.

La seconde série en orange présente des ions moins intenses que pour la première série. Les ions de rapport masse sur charge m/z 1850,8 (10+) ; 2056,5 (9+) ; 2313,3 (8+) et 2643,4 (7+) permettent de déterminer une masse moléculaire de $18498 \pm 1 \text{ g.mol}^{-1}$, soit un complexe non covalent de stœchiométrie 2/1.

La troisième série en violet comporte les ions à m/z 1964,2 (5+) et 2455,1 (4+) correspondant au complexe de stœchiométrie 1/1. Tout comme pour T11, les ions du complexe 1/1 sont accompagnés de pics à plus faible rapport m/z correspondant à la perte successive d'un groupement sulfate (astérisques rouges).

La présence du tetrasaccharide inversé T21 (de même poids moléculaire que T12) dans l'électrolyte conduit au spectre de masse de la Figure 54. Hormis les ions caractéristiques de la chimiokine MCP-1, trois autres séries sont observées. La première en orange est composée par les ions à m/z 1850,9 (10+) ; 2056,4 (9+) ; 2313,4 (8+) et 2643,5 (7+). Ces ions conduisent au calcul d'une masse moléculaire de $18499 \pm 1 \text{ g.mol}^{-1}$, soit un complexe de stœchiométrie 2/1.

La seconde série en bleu est composée par deux ions aux états de charge 4+ (m/z 2455,3) et 5+ (m/z 1964,5) et correspond à une masse moléculaire de $9817,0 \pm 0,2 \text{ g.mol}^{-1}$. Cette masse correspond au complexe non covalent formé par une protéine MCP-1 et une molécule de T21 ($M = 1134 \text{ g.mol}^{-1}$). Ces deux ions sont accompagnés chacun d'un pic m/z distant de 80 unités de masse, soit une perte d'un groupement sulfate.

La dernière série la plus intense en violet est composée par les ions aux états de charge 10+, 9+, 8+ et 7+. La masse calculée à $19631 \pm 3 \text{ g.mol}^{-1}$ correspond au complexe non covalent de stœchiométrie 2/2. L'inversion des disaccharides dans T21 conduit à un spectre de masse identique à celui de T12, ce qui était aussi le cas pour la chimiokine SDF-1 α . Quelque soit la position du disaccharide majoritaire, extrémité réductrice ou non réductrice, nous observons la formation des complexes 2/1 et 2/2.

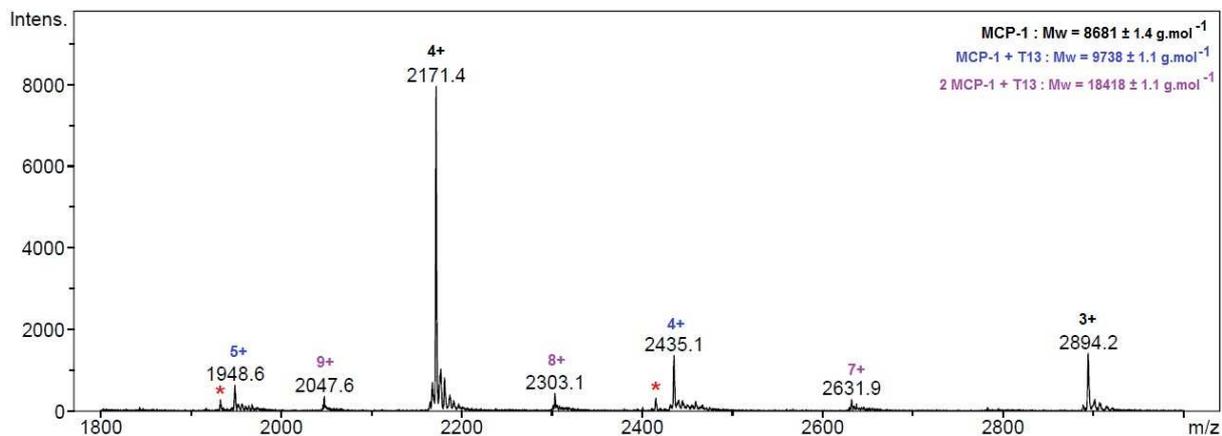


Figure 55 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T13 obtenu par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μM de T13; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s .
 Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z.
 Nébulation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C.

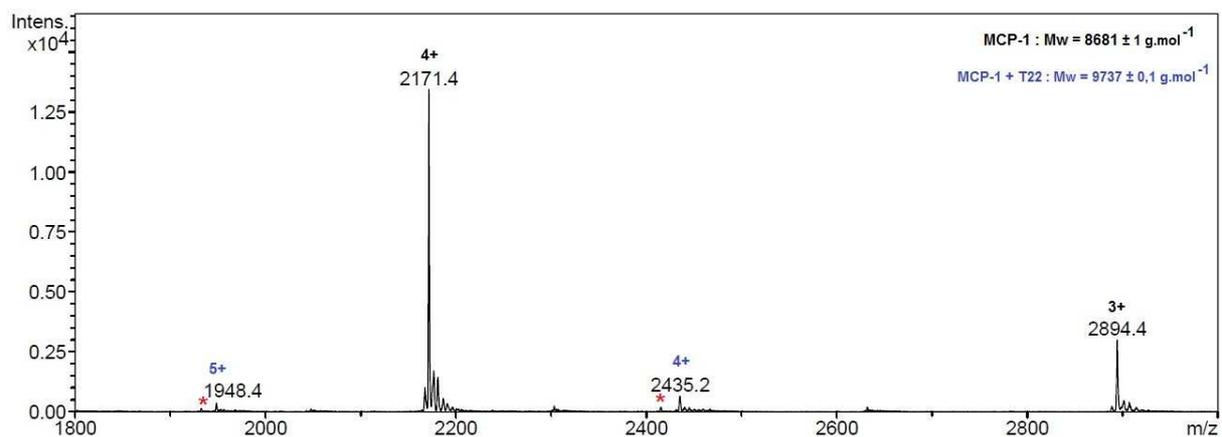


Figure 56 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T22 obtenu par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μM de T22; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s .
 Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z.
 Nébulation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C.

- **Complexes formés entre MCP-1 et le tetrasaccharide T13 et T22**

Le spectre de masse de la Figure 55 a été obtenu en présence de T13 dans l'électrolyte de séparation. Deux séries sont observées en plus des ions caractéristiques de la protéine monomérique MCP-1. En violet, les ions de la première série à m/z 2047,6 (9+) ; 2303,1 (8+) et 2361,9 (7+) conduisent à une masse moléculaire de $18418 \pm 1,1 \text{ g.mol}^{-1}$, soit un complexe non covalent formé par deux protéines MCP-1 et une molécule de T13 ($M = 1054 \text{ g.mol}^{-1}$). La seconde série la plus intense en bleu présente deux ions à m/z 1948,6 (5+) et m/z 2435,1 (4+) et correspondent à une masse moléculaire de $9738 \pm 1,1 \text{ g.mol}^{-1}$. La masse calculée est celle d'un complexe non covalent de stœchiométrie 1/1. Les deux ions de cette série présentent une perte de groupement sulfate (astérisque rouge). Le complexe 1/1 semble ne pas être très stable en phase gazeuse, ce qui expliquerait cette perte de groupement sulfate.

La présence de T22 dans le tampon de séparation conduit au spectre de masse présenté dans la Figure 56. Contrairement à SDF-1 α , le spectre de masse n'est pas identique à celui obtenu avec T13. Une seule série d'ions très peu intense est observée en plus des ions caractéristiques de MCP-1. La série en bleu présente les ions aux états de charge 4+ (m/z 2435,2) et 5+ (1948,4), soit une masse moléculaire de $9737 \pm 0,1 \text{ g.mol}^{-1}$. Le complexe non covalent formé est de stœchiométrie 1/1. Chacun des deux ions de cette série met également en évidence une perte d'un groupement sulfate (astérisque rouge), montrant encore une fois que le complexe 1/1 ne doit pas être stable en phase gazeuse. Le tetrasaccharide T22 ne permet pas de promouvoir la dimérisation de la chimiokine MCP-1. La présence de deux disaccharides minoritaires de l'héparine n'est donc pas suffisante pour une réelle interaction, et donc une dimérisation, contrairement aux tetrasaccharides T11, T12, T13 et T21. Cette observation confirme les résultats observés par ACE avec l'absence d'une variation de la mobilité électrophorétique en présence de T22.

- **Complexes formés entre MCP-1 et le tetrasaccharide T23**

La présence de T23 dans l'électrolyte conduit au spectre de masse de la Figure 57. Comme pour T22, seuls deux ions sont détectés en plus des ions caractéristiques de MCP-1. La série en bleu est composée des ions à m/z 1932,5 (5+) et 2415,2 (4+), soit une masse moléculaire de $9657 \pm 0,5 \text{ g.mol}^{-1}$. Cette masse correspond au complexe non covalent de stœchiométrie 1/1. De la même façon que pour T22, la présence de deux unités disaccharidiques minoritaires de l'héparine ne permet pas la dimérisation de la chimiokine MCP-1.

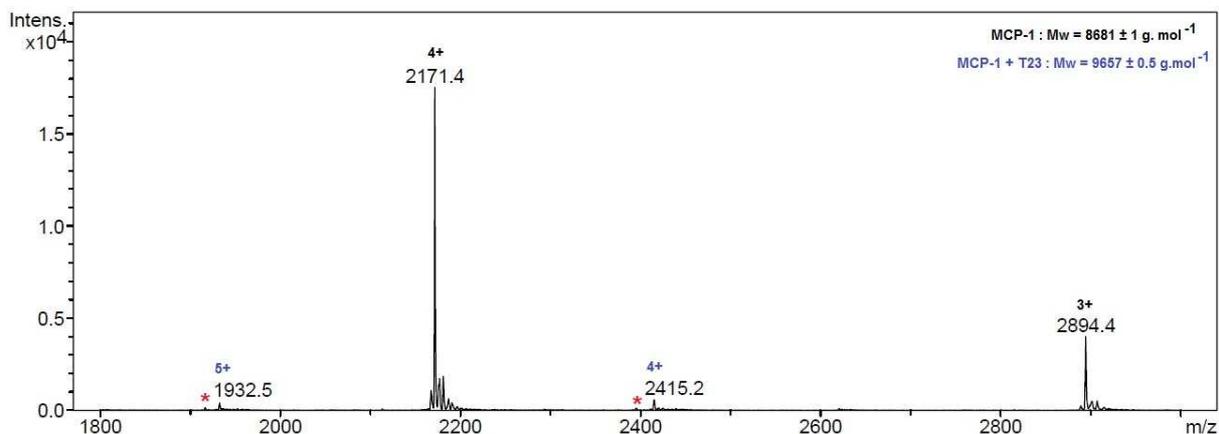


Figure 57 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de T23 obtenus par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μM de T23; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s .
 Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z.
 Nébulation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C.

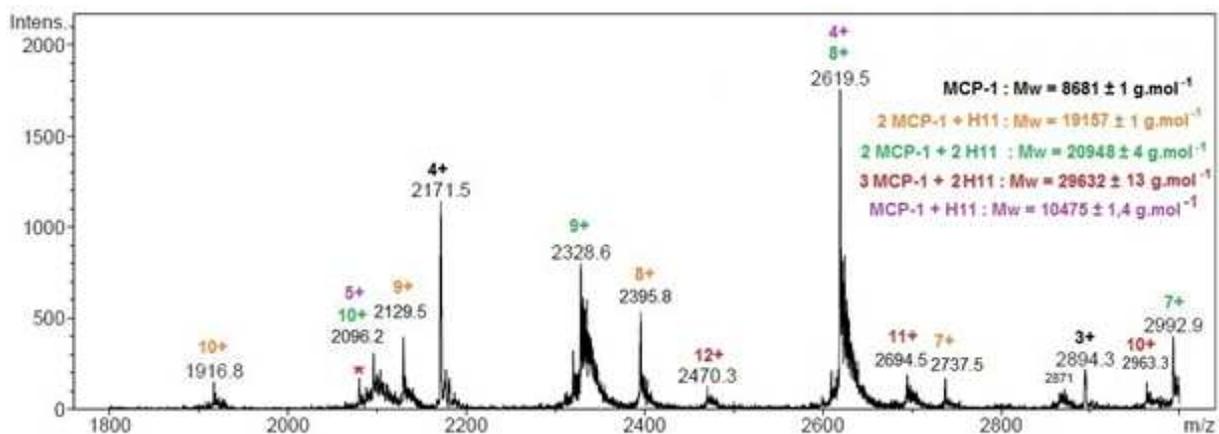


Figure 58 : Spectre de masse de MCP-1 en présence de H11 obtenus par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 3 μM de H11; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s .
 Liquide d'appoint : méthanol 10%, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z, gamme de masse 1800-3000 m/z.
 Nébulation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C.

- **Complexes formés entre MCP-1 et l'hexasaccharide H11**

Le spectre de masse de la Figure 58 a été réalisé en présence de l'hexasaccharide nonasulfaté H11. Quatre séries ont été détectées en plus des ions caractéristiques de MCP-1 (en noir). La première série en vert, est la série la plus intense. Elle est composée par les ions aux rapports masse sur charge m/z 2096,2 (10+) ; 2328,6 (9+) ; 2619,5 (8+) et 2992,9 (7+). La masse calculée est de $20948 \pm 4 \text{ g.mol}^{-1}$ et correspond au complexe non covalent formé par deux protéines MCP-1 et deux molécules H11 ($M = 1791 \text{ g.mol}^{-1}$). Le complexe 2/2 mène aux ions les plus intenses.

La seconde série en orange est composée par les ions aux états de charge 7+ (m/z 2737,5) ; 8+ (m/z 2395,8) ; 9+ (m/z 2129,5) et 10+ (1916,8). La masse calculée pour cette série est de $19157 \pm 1 \text{ g.mol}^{-1}$. Le complexe non covalent formé est de stœchiométrie 2/1.

La troisième série en rouge est formée par les ions à m/z 2470,3 (12+) ; 2694,5 (11+) et 2963,3 (10+). La masse moléculaire calculée est de $29632 \pm 13 \text{ g.mol}^{-1}$. Le complexe ainsi formé est de stœchiométrie 3/2.

La dernière série en violet est formée par les ions à m/z 2096,2 (5+) et 2619,5 (4+) correspondant au complexe non covalent de stœchiométrie 1/1. L'ion 5+ présente une perte de groupement sulfate (astérisque rouge).

L'augmentation du nombre de groupements sulfate ne permet pas d'observer une stœchiométrie supérieure à 3/2. Il se pourrait que le complexe 3/2 provienne d'un complexe d'ordre supérieur (4/2 ou 4/4) possédant une intensité trop faible pour être détecté en MS.

IV.3.3 Discussion générale

Il a été montré par nESI/IMS-MS que MCP-1 forme un complexe non covalent de stœchiométrie 2/1 avec le pentasaccharide Arixtra (Figure 5) [358]. Cela a également été montré en utilisant d'autres sources ESI, comme par exemple la dimérisation de MCP-1 en présence d'un octasaccharide d'héparine [359]. Il a été observé que des trimères ou tetramères étaient capable de lier une molécule d'Arixtra. Toutefois, les auteurs mettent en doute l'importance de ces résultats à cause de la très faible intensité des ions observés [358].

Le couplage ACE-MS nous a permis de mettre en évidence de nouvelles stœchiométries pour des complexes MCP-1/oligosaccharides de synthèse. Contrairement à

la chimiokine SDF-1 α , les spectres de masse obtenus ne sont pas identiques pour les tetrasaccharides possédant le même nombre de groupements sulfate. D'après les résultats obtenus, pour promouvoir la dimérisation de MCP-1, il faut un tetrasaccharide possédant au moins 4 groupements sulfate. Cette observation apporte une précision sur les précédents résultats menés au laboratoire sur la chimiokine MCP-1 [476] qui concluaient que le nombre minimum de groupements sulfate devait être de 5. Cependant, ces analyses avaient été réalisées en présence de fractions d'énoxaparine hétérogènes en masse et de structure non définie. Le tetrasaccharide T22 possédant également 4 groupements sulfate ne permet pas la dimérisation de la chimiokine MCP-1. La présence de deux disaccharides minoritaires n'est donc pas suffisante pour une dimérisation. Le tetrasaccharide T13, ayant le même degré de sulfatation, c'est-à-dire 4, est quant à lui en mesure de promouvoir la dimérisation. Il semblerait que la présence d'un disaccharide majoritaire soit nécessaire pour la dimérisation de MCP-1 contrairement à SDF-1 α où malgré l'absence d'un disaccharide majoritaire (T22) la dimérisation avait lieu.

Cette hypothèse est vérifiée par les tetrasaccharides T12 et T21 ne possédant qu'un disaccharide majoritaire dans leur structure. Pour T12 et T21, la stœchiométrie 2/1 est en effet observée. En revanche, seul le tetrasaccharide T12 conduit au complexe de stœchiométrie 2/2 dans des proportions notables. Cette stœchiométrie est en accord avec les calculs de modélisation concluant que le complexe incluant le dimère de MCP-1 se fait en présence de deux molécules d'oligosaccharide [217]. L'hypothèse précédente peut être complétée par le fait que pour obtenir le complexe 2/2 le disaccharide majoritaire doit être du côté non-réducteur dans la séquence du tetrasaccharide.

La présence de deux disaccharides majoritaires dans la séquence du tetrasaccharide (T11) conduit à la formation d'un complexe de stœchiométrie 3/2 (peu intense), en plus des complexes 2/2 et 2/1. La présence des 6 groupements sulfate semble donc être le minimum pour former des complexes de stœchiométrie supérieure au dimère de MCP-1. En présence de H11, les mêmes stœchiométries que pour T11 sont observées, contrairement à SDF-1 α où H11 permettait de stabiliser uniquement le complexe 2/1. Les ions observés pour le complexe 3/2 sont plus intenses pour H11 que pour T11. Il semblerait que l'augmentation du degré de sulfatation, et donc de la taille de l'oligosaccharide, favorise la stabilisation du complexe 3/2, bien que ce complexe reste minoritaire par rapport au complexe 2/2.

Les résultats obtenus par ACE-MS mettent donc en évidence que la chimiokine MCP-1 est en mesure de former des complexes de stœchiométrie supérieure au complexe 2/2. Au regard des données obtenues, la taille de l'oligosaccharide doit avoir un rôle dans la formation du tetramère de MCP-1, s'il existe.

IV.4 Conclusion et perspectives

La CE et le couplage ACE-MS nous ont permis de mettre en évidence le rôle de la séquence de tetrasaccharides de synthèse dans une interaction avec la chimiokine MCP-1 et dans la capacité à promouvoir la dimérisation de MCP-1. Le couplage a également permis de détecter un complexe de stœchiométrie supérieure 3/2, par rapport à celle qui était connue dans la littérature, à savoir 2/2.

Ces résultats conduisent à de nouvelles perspectives quant à l'interaction de la chimiokine MCP-1 avec les GAGs. En effet, l'étude de l'interaction en présence d'oligosaccharides de taille plus importante permettrait de savoir si d'autres stœchiométries peuvent être observées.

Tout comme SDF-1 α , la variation de la position des groupements sulfate sur l'hexasaccharide peut être envisagée si la construction chimique des saccharides le permet. D'autres types de GAGs peuvent être étudiés afin de se rapprocher de la structure idéale du GAG dans l'optique d'un mimétique.

CHAPITRE 5 : OLIGOMERISATION DE L'INTERFERON GAMMA HUMAIN

V.1 Introduction

Les deux chapitres précédents ont mis en évidence que des variations structurales fines de la structure du GAG conditionnent l'interaction chimiokine/GAG. Cependant, les chimiokines ne sont pas les seuls membres de la famille des cytokines à interagir avec les GAGs. L'interaction entre les GAGs et l'interféron gamma humain (IFN γ) a également été mise en évidence. Le ligand principal de l'IFN γ identifié est l'héparane sulfate (HS), avec une affinité de l'ordre de 1,5 nM [59]. Des études *in vivo* ont montré que la fixation de l'IFN γ aux HS régulait l'élimination plasmatique, la distribution tissulaire et l'accumulation locale de la protéine. Ainsi l'adhésion aux HS permet de localiser, protéger et moduler les effets de l'IFN γ [60, 396, 406].

Contrairement aux chimiokines, l'IFN γ peut interagir indépendamment d'une liaison aux HS avec son récepteur l'IFN γ R permettant ainsi la transduction du signal ou avec d'autres GAGs. L'IFN γ constitue donc une cible thérapeutique, et de nombreux travaux [407] sont réalisés dans le but de déterminer la structure du ligand oligosaccharidique permettant d'inhiber la liaison de l'IFN γ à HS et à l'IFN γ R. Cependant, il reste à connaître la structure et la stœchiométrie de la cytokine complexée à l'HS et également la nature du protéoglycane HS auquel l'IFN γ se lie, ainsi que le rôle de ce protéoglycane dans l'activité biologique de l'IFN γ .

Les travaux présentés dans ce chapitre s'inscrivent dans une collaboration avec l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Dans le but de déterminer la stœchiométrie des complexes par spectrométrie de masse, entre l'IFN γ et des oligosaccharides sulfatés (ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant), le couplage CE-MS décrit précédemment a été mis en œuvre. Cependant, l'analyse par spectrométrie de masse dans des conditions dites « natives » n'avait également jamais été réalisée. L'IFN γ étant un homodimère naturel (34 kDa), les conditions expérimentales ont du être optimisées pour ne pas déstabiliser l'homodimère en phase gazeuse.

Dans le but de caractériser le(s) ligand(s) oligosaccharidique(s) ayant le plus d'affinité pour l'IFN γ grâce à une stratégie de « ligand fishing », de la chromatographie d'affinité a été réalisée par nos partenaires. Les fractions recueillies ont été étudiées par ACE.

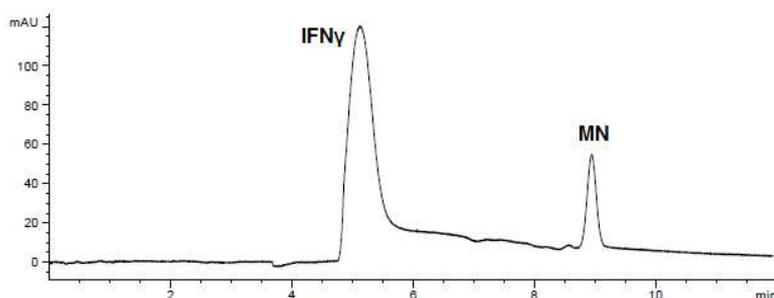


Figure 59 : Electrophorégramme de l'IFN γ sur capillaire greffé HPC.

Capillaire HPC, 50 μ m d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μ M ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

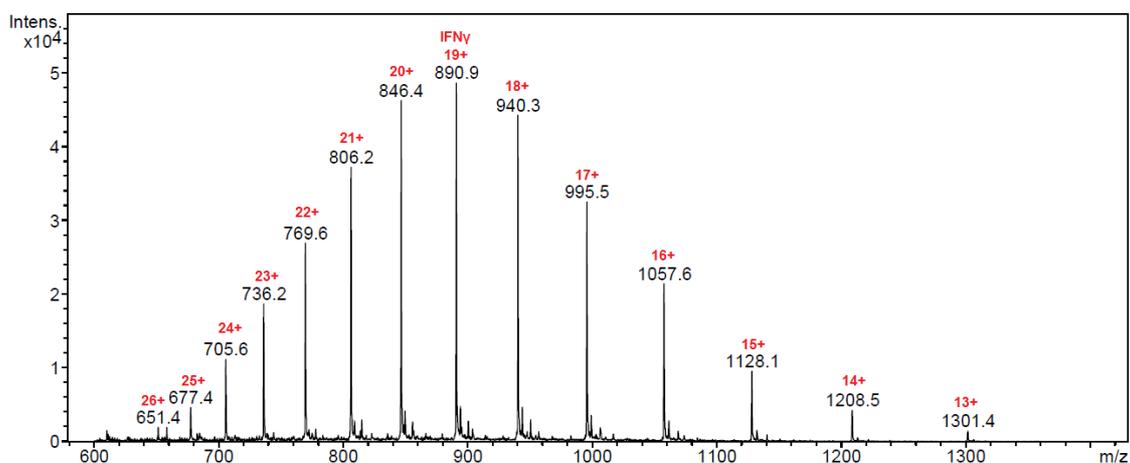


Figure 60 : Spectre de masse de l'IFN γ obtenu par CE-MS dans des conditions dénaturantes.

Capillaire greffé HPC, 50 μ m d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60s (15 μ M IFN γ). Liquide d'appoint : eau/acétonitrile (60/40, v/v) à 1% d'AF, 3 μ L.min $^{-1}$. Masse cible 1000 m/z. Gamme de masse 600 – 1400 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min $^{-1}$ à 150°C.

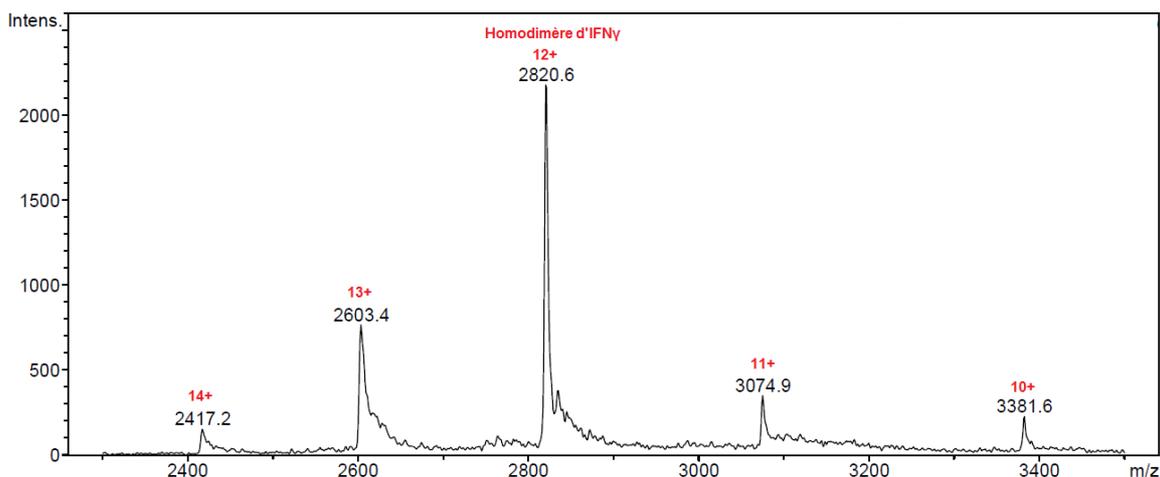


Figure 61 : Spectre de masse de l'IFN γ obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces.

Capillaire greffé HPC, 50 μ m d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s (15 μ M IFN γ). Liquide d'appoint : acétate d'ammonium 20 mM, pH 5, 3 μ L.min $^{-1}$. Masse cible 3000 m/z. Gamme de masse 2300 – 3500 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min $^{-1}$ à 150°C.

V.2 Détection de l'IFN γ par CE-MS

A la différence des chimiokines qui coexistent sous forme monomère/dimère en solution [217, 353, 359], l'IFN γ a une structure homodimérique très stable. Lors de l'étude de l'IFN γ , une première interrogation était de savoir si la modification du capillaire d'électrophorèse par l'hydroxypropylcellulose (HPC) permettrait une migration correcte de la protéine vers le spectromètre de masse. La seconde interrogation concernait la stabilité en phase gazeuse de l'homodimère : pourrait-il être détecté dans le piège à ions utilisé pour le couplage CE-MS au laboratoire ? Pour répondre à ces interrogations, deux types d'analyses ont été mis en œuvre. Chaque analyse utilise un liquide additionnel différent (dénaturant ou non) et une détection MS dans une gamme de masse différente (bas ou hauts rapports m/z).

Le choix du greffage par l'HPC est adapté à la séparation électrophorétique de l'IFN γ , car cette protéine n'est pas retenue dans le capillaire d'électrophorèse. L'électrophorégramme de la Figure 59 met en évidence un pic assez fin pour l'IFN γ avant le marqueur neutre (MN), montrant ainsi le caractère basique de la protéine. En effet, le point isoélectrique (pI) de l'IFN γ a fait l'objet d'une étude par CIEF-MS en collaboration avec le Laboratoire de Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA). Les résultats, non montrés dans ce manuscrit, ont conduit à la détermination d'un point isoélectrique de 8,6 pour l'homodimère de l'IFN γ , ce qui n'avait jamais été fait auparavant. La mobilité électrophorétique déterminée pour l'IFN γ est $\mu_{ep,IFN\gamma} = 16,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Comme pour la chimiokine MCP-1, l'augmentation de la masse moléculaire et la diminution du pI conduisent à une plus faible mobilité électrophorétique que pour la chimiokine SDF-1 α .

Un premier spectre de masse ESI (mode positif) a été réalisé par CE-MS (capillaire HPC) dans des conditions dites « dénaturantes » (Figure 60) en utilisant un liquide additionnel eau/acétonitrile (60/40, v/v) à 1% acide formique (AF) et une gamme de masse dans les bas rapports m/z. Les états de charges observés (13+ à 26+) permettent de calculer une masse moléculaire moyenne $M = 16908 \pm 1,9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Cette masse correspond au polypeptide constitutif de l'IFN γ . Le spectre de masse de la Figure 61 a été réalisé dans des conditions dites « natives » à l'aide d'un liquide additionnel constitué d'acétate d'ammonium 20 mM à pH 5. Ce liquide, optimisé dans des précédents travaux au laboratoire [476], permettait de détecter correctement la forme native de l'antithrombine d'une masse moléculaire (58 kDa) supérieure à celle de l'IFN γ . Les ions de rapport m/z obtenus : 3381,6 (10+) ; 3074,9 (11+) ; 2820,6 (12+) ; 2603,4 (13+) et 2417,2 (14+) conduisent à une masse moléculaire moyenne $M = 33822 \pm 12,4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ correspondant à l'homodimère de l'IFN γ .

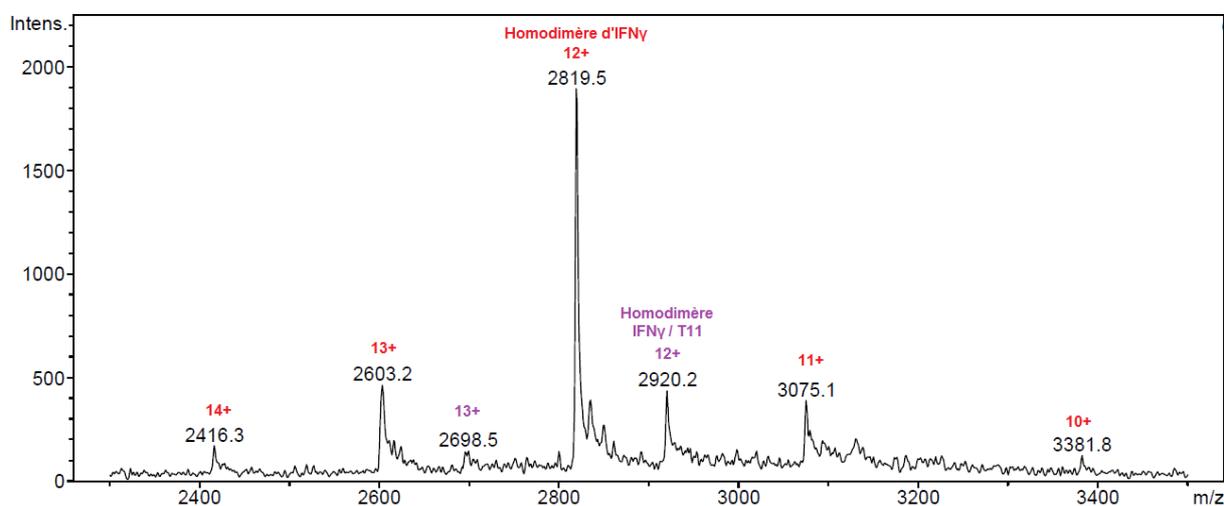


Figure 62 : Spectre de masse de l'IFN γ en présence de T11 obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces après incubation de 1 h.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s (20 μM IFN γ / 18 μM de T11).
 Liquide d'appoint : acétate d'ammonium 20 mM, pH 5, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z. Gamme de masse 2300 – 3500 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ à 150°C. Incubation à température ambiante (T = 22° C).

Cependant, l'intensité de ces ions environ 20 fois plus faible, que celle des ions de la Figure 60 est due à la masse moléculaire de la protéine qui, dans les conditions « natives », conduit à des états de charges plus faibles donc à des rapports m/z plus élevés. La gamme de masse du spectromètre de masse a donc été ajustée aux hauts rapports m/z (gamme étendue, 200 – 6000 m/z au lieu de 50 – 3000 m/z), conduisant à une accumulation et à une stabilisation moins importantes des ions dans la trappe, provoquant ainsi des spectres de masse d'intensité et de résolution plus faibles comme cela avait été démontré pour l'antithrombine [448, 476]. Malgré cela, nous avons étudié l'interaction entre l'IFN γ et des GAGs par CE-MS et ACE-MS. Dans la suite de ce chapitre, l'appellation IFN γ dans les spectres de masse correspondra toujours à la forme homodimérique de la protéine.

V.3 Complexes IFN γ / Oligosaccharides de synthèse par CE-MS

L'interaction de l'IFN γ avec des oligosaccharides de synthèse sulfatés de type héparine comportant 3 groupements sulfate par disaccharide a été étudiée, dans le but de mettre en œuvre une stratégie de « ligand fishing » en utilisant le couplage CE-MS. Ces oligosaccharides représentent un bon modèle *in vitro* des domaines NS de l'héparane sulfate, ligand principal de l'IFN γ , sans présager de la longueur. Ce travail préliminaire a essentiellement consisté à optimiser les paramètres du spectromètre de masse couplé à l'électrophorèse capillaire. L'IFN γ possédant une très forte affinité pour l'HS [59], une question s'est posée quant à la possibilité de détecter par CE-MS un complexe IFN γ /oligosaccharide de type héparine préalablement incubé, c'est-à-dire sans remplir le capillaire d'oligosaccharide. Cette expérience a été réalisée pour trois oligosaccharides : le tetrasaccharide hexasulfaté T11, l'hexasaccharide nonasulfaté H11 et l'octasaccharide dodecasulfaté O11. L'incubation a été réalisée pendant 1 h à température ambiante (T = 22°C) dans une solution d'acétate d'ammonium 75 mM à pH 6,5 (tampon de séparation). Les concentrations de l'IFN γ et de l'oligosaccharide ont été choisies équimolaires (1 homodimère d'IFN γ / 1 oligosaccharide) afin de favoriser la détection par spectrométrie de masse.

Le spectre de masse de la Figure 62 a été obtenu après incubation de l'IFN γ avec le tetrasaccharide T11. En plus des ions caractéristiques de l'IFN γ (en rouge) donnant une masse moléculaire de $M = 33818 \pm 7,9 \text{ g.mol}^{-1}$, deux ions très peu intenses ont été détectés (en violet). Les ions à m/z 2698,5 (13+) et 2920,2 (12+) conduisent à une masse moléculaire moyenne de $M = 35049 \pm 26,2 \text{ g.mol}^{-1}$.

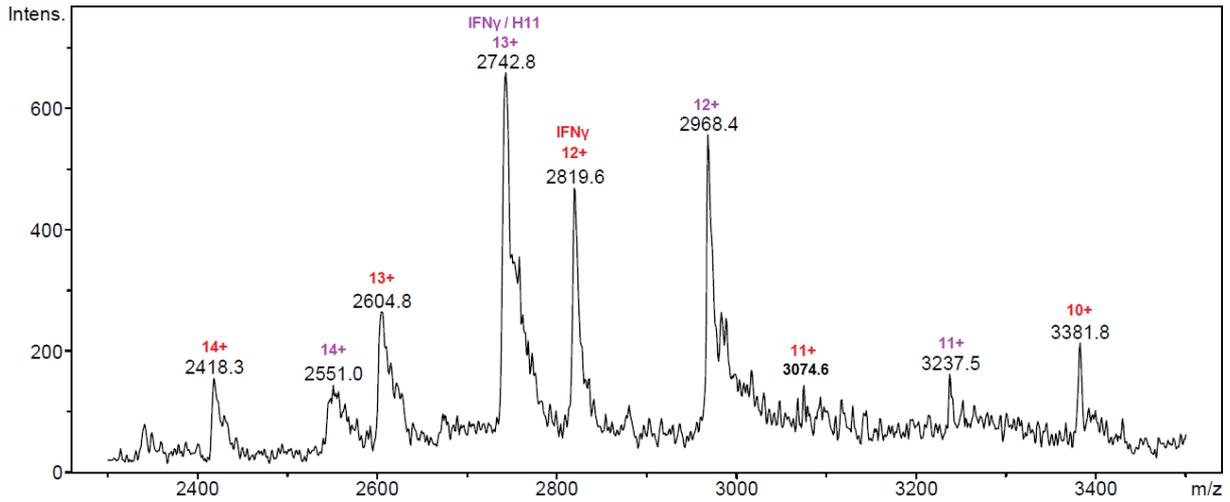


Figure 63 : Spectre de masse de l'IFN γ en présence de H11 obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces après incubation de 1 h.

Capillaire greffé HPC, 50 μ m d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s (18 μ M IFN γ / 17 μ M de H11). Liquide d'appoint : acétate d'ammonium 20 mM, pH 5, 3 μ L.min⁻¹. Masse cible 3000 m/z. Gamme de masse 2300 – 3500 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C. Incubation à température ambiante (T = 22° C).

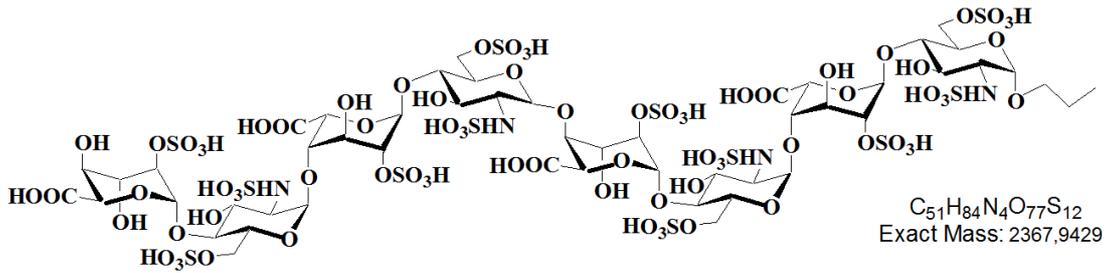


Figure 64 : Structure de l'oligosaccharide de synthèse dodecasulfaté O11.

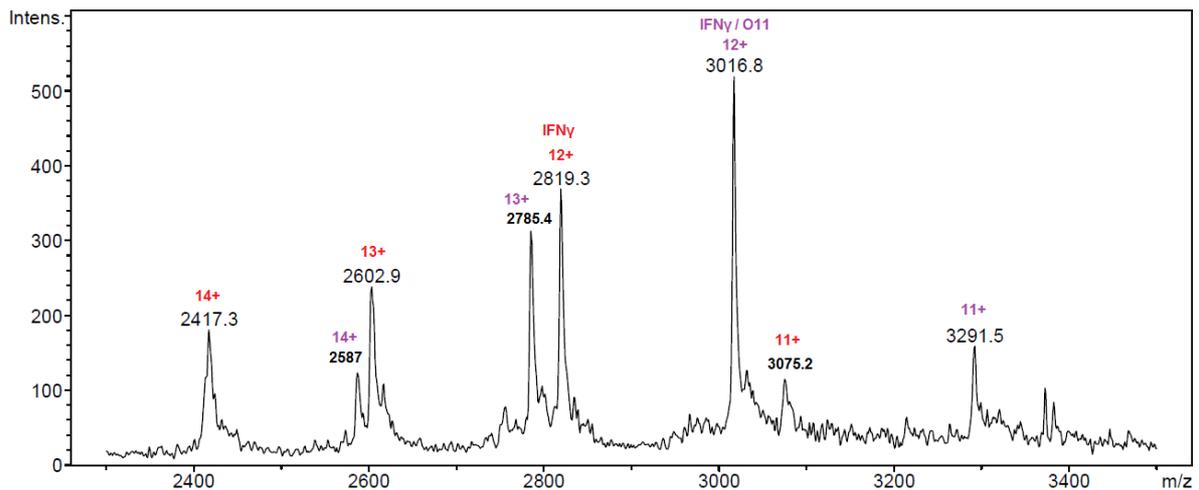


Figure 65 : Spectre de masse de l'IFN γ en présence de O11 obtenu par CE-MS dans des conditions d'ionisation douces après incubation de 1 h.

Capillaire greffé HPC, 50 μ m d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s (18 μ M IFN γ / 17 μ M de O11). Liquide d'appoint : acétate d'ammonium 20 mM, pH 5, 3 μ L.min⁻¹. Masse cible 3000 m/z. Gamme de masse 2300 – 3500 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 L.min⁻¹ à 150°C. Incubation à température ambiante (T = 22° C).

Cette masse est celle d'un complexe non covalent formé entre un homodimère de l'IFN γ et une molécule de T11 ($M_{\text{théorique}} = 1214,0 \text{ g.mol}^{-1}$).

L'incubation de l'IFN γ avec l'hexasaccharide H11 a conduit au spectre de masse de la Figure 63 obtenu par CE-MS. Une série d'ions (en violet) apparaît en plus des ions caractéristiques de l'IFN γ (en rouge ; $M = 33826 \pm 18,8 \text{ g.mol}^{-1}$). Les ions aux états de charge 11+, 12+, 13+ et 14+, correspondant respectivement aux rapports m/z 3237,5 ; 2968,4 ; 2742,8 et 2551,0 conduisent à une masse moléculaire moyenne $M = 35638 \pm 44,9 \text{ g.mol}^{-1}$. Cette masse correspond au complexe non covalent formé entre un homodimère de l'IFN γ et une molécule H11 ($M_{\text{théorique}} = 1791 \text{ g.mol}^{-1}$). Contrairement au spectre de la Figure 62 avec T11, l'interaction IFN γ /H11 conduit à des ions correspondant au complexe plus intenses que la forme non liée de l'IFN γ .

L'incubation de l'IFN γ pendant une heure avec l'octasaccharide O11 (Figure 64) a conduit au spectre de masse présenté dans la Figure 65. Comme pour les spectres précédents de l'IFN γ en présence d'oligosaccharide, le spectre de masse obtenu en présence de O11 présente les ions caractéristiques de l'homodimère de l'IFN γ (en rouge ; $M = 33822 \pm 5,3 \text{ g.mol}^{-1}$). Une autre série (en violet) constituée des ions de rapport m/z 2587 (14+); 2785,4 (13+); 3016,8 (12+) et 3291,5 (11+) conduit au calcul d'une masse moléculaire moyenne $M = 36197 \pm 5,9 \text{ g.mol}^{-1}$. Cette masse correspond au complexe non covalent formé par un homodimère de l'IFN γ et une molécule O11 ($M_{\text{théorique}} = 2368 \text{ g.mol}^{-1}$). Là encore, les ions correspondant au complexe IFN γ /O11 sont plus intenses que ceux de l'IFN γ libre, et dans les mêmes proportions que pour le complexe IFN γ /H11 (Figure 63).

Les expériences d'incubation de l'IFN γ avec un oligosaccharide de synthèse sulfaté de type héparine, nous ont permis de mettre en évidence la formation de complexes non covalents homodimère IFN γ /oligosaccharide sulfaté. L'interaction homodimère IFN γ /oligosaccharide sulfaté semble donc assez forte (K_d certainement faible) pour maintenir le complexe non covalent dans le capillaire d'électrophorèse dépourvu d'oligosaccharide. Cela n'avait pas été le cas dans les travaux précédents menés au laboratoire avec une incubation de SDF-1 α et de MCP-1 avec des oligosaccharides sulfatés [476]. Cependant, l'interaction en présence de T11 conduit uniquement à deux pics de faible intensité, ce qui implique certainement une plus faible interaction que pour H11 ou O11.

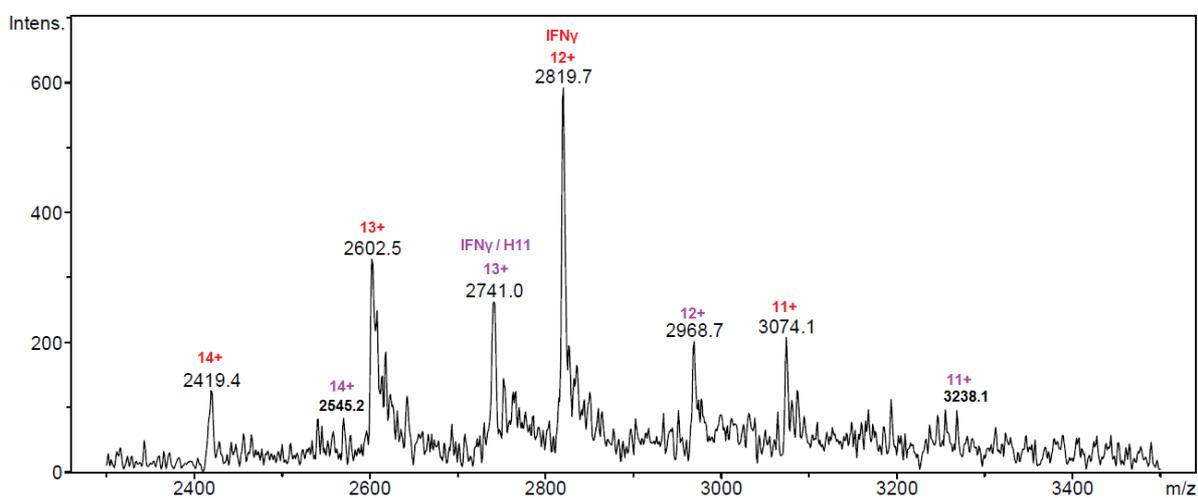


Figure 66 : Spectre de masse de l'IFN γ en présence de H11 obtenu par ACE-MS.

Capillaire greffé HPC, 50 μm d.i., L = 70 cm. Electrolyte : acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5 contenant 5 μM de H11 ; tension appliquée + 10 kV ; pression appliquée + 50 mbar, température 25°C. Injection 50 mbar 60 s (18 μM IFN γ). Liquide d'appoint : acétate d'ammonium 20 mM, pH 5, 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Masse cible 3000 m/z. Gamme de masse 2300 – 3500 m/z. Nébulisation 5 psi, séchage 3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ à 150°C. Incubation à température ambiante (T = 22°C).

De plus, si l'on compare les spectres de masse en présence d'oligosaccharide à celui de l'IFN γ sans oligosaccharide, on remarque que l'intensité absolue des ions ne dépasse pas 1000, contre 2000 pour la forme de l'IFN γ non liée à un GAG. Cette baisse d'intensité peut s'expliquer soit par la détection d'une espèce moléculaire sous plusieurs ions, soit par une difficulté pour le complexe IFN γ /oligosaccharide à être transféré en phase gazeuse en mode positif. Nous pouvons faire l'hypothèse que le complexe moins chargé positivement en présence de l'oligosaccharide, offre une moins bonne réponse en spectrométrie de masse. Quoi qu'il en soit, les intensités observées sont bien plus faibles que pour SDF-1 α ou MCP-1 en présence d'oligosaccharides sulfatés. Cette différence est certainement due au changement au niveau de la gamme de masse (haut m/z pour l'IFN γ) ainsi qu'à la masse de la protéine. Par conséquent, et cela constitue un problème qu'il faudra régler par la suite, si d'autres complexes de stœchiométrie supérieure sont présents, ils ne seront pas détectés du fait de l'intensité des ions.

V.4 Complexes IFN γ / Oligosaccharides de synthèse par ACE-MS

Dans le but de mettre en œuvre la stratégie de « ligand fishing » mais également de régler le problème lié à l'intensité en présence d'oligosaccharide, des expériences ACE-MS en présence des tetra-, hexa et octasaccharides T11, H11 et O11 ont été réalisées, c'est-à-dire avec l'oligosaccharide présent dans l'électrolyte de séparation. Dans un premier temps, les concentrations quasiment équimolaires des espèces (18 μ M IFN γ / 17 μ M GAG) ont été choisies. Aucun signal MS, et ce pour chacun des oligosaccharides, n'a été détecté en spectrométrie de masse à la suite du couplage ACE-MS.

L'hypothèse pouvant expliquer cette absence de signal est celle qui avait déjà été proposée dans les travaux précédents du laboratoire [476] pour SDF-1 α (Chapitre 3), à savoir que la forte concentration (17 μ M) de l'oligosaccharide dans l'électrolyte de séparation déstabiliserait le spray. La diminution de la concentration dans l'électrolyte à 5 μ M au lieu de 17 μ M d'oligosaccharide a conduit à un spectre de masse ACE-MS pour H11 (Figure 66). En plus des ions caractéristiques de l'IFN γ (en rouge ; $M = 33826 \pm 22,5 \text{ g.mol}^{-1}$), une série d'ions en violet a été détectée : m/z 2545,2 (14+) ; 2741,0 (13+) ; 2968,7 (12+) et 3238,1 (11+). Ces ions conduisent à une masse moléculaire moyenne $M = 35615 \pm 6,5 \text{ g.mol}^{-1}$. Cette masse correspond au complexe non covalent formé par l'homodimère de l'IFN γ et une molécule de H11 ($M_{\text{théorique}} = 1791 \text{ g.mol}^{-1}$).

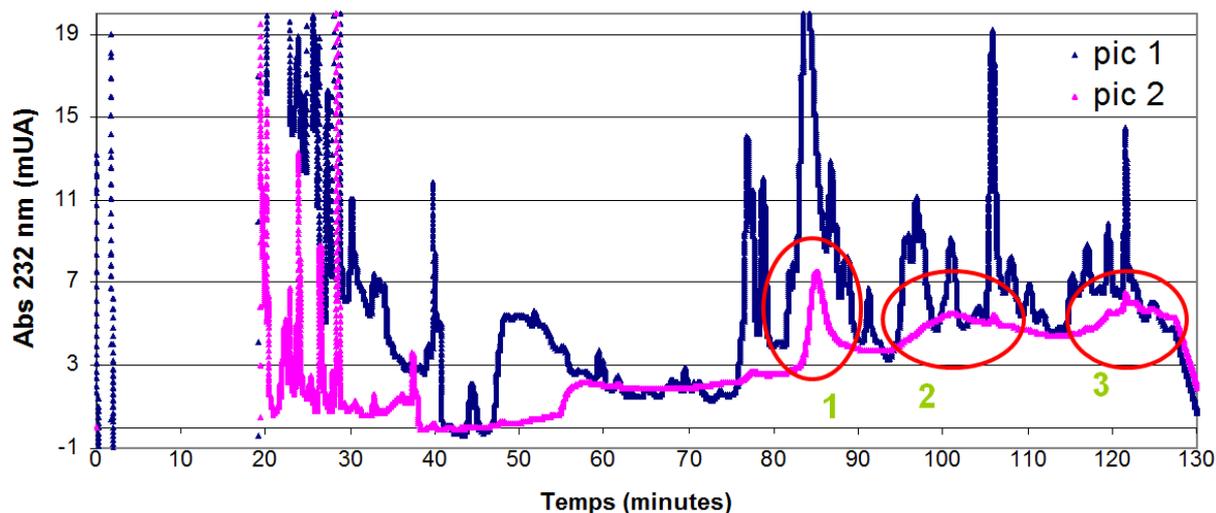


Figure 67 : Chromatogramme obtenu par HPLC.

Analyses par colonne Propac PA1 HPLC (gradient de sel 0-1 M, absorbance 232 nm) suite à une analyse par chromatographie d'affinité C-terminale de l'IFN γ avec en bleu le chromatogramme du pic non retenu et en rose celui du pic retenu en chromatographie d'affinité.

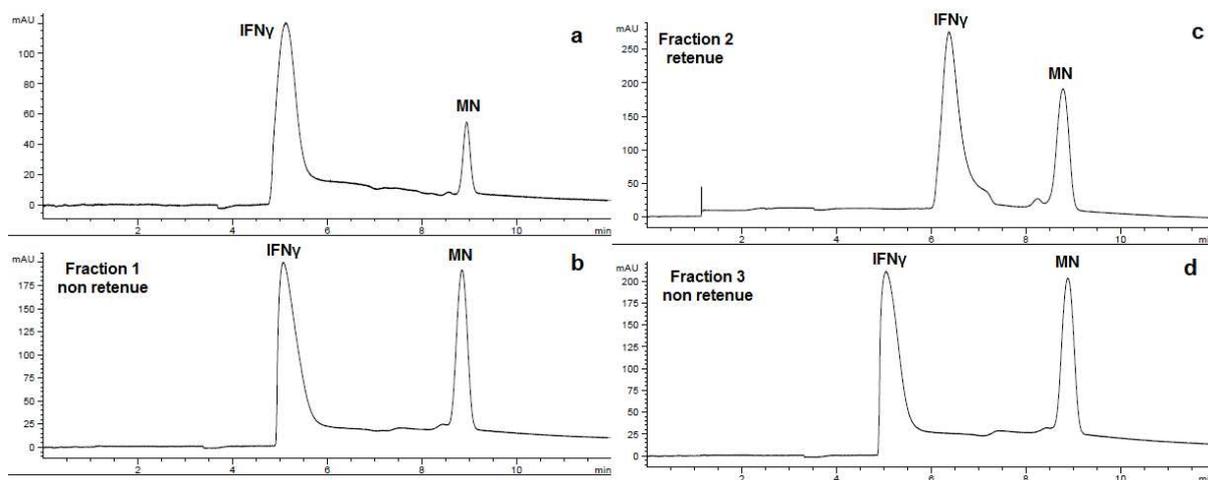


Figure 68 : Electrophorégramme de l'IFN γ en présence des fractions récoltées par HPLC.

Capillaire HPC, 50 μ m d.i. ; L = 34 cm ; l = 25,5 cm (UV 200 nm) ; électrolyte : acétate d'ammonium 75 mM pH 6,5 contenant (a) aucun oligosaccharide, (b) F1, (c) F2 et (d) F3 ; tension appliquée + 8 kV ; pression appliquée + 15 mbar ; température 25°C. Injection : 50 mbar 30 s de protéine 15 μ M ; MN = marqueur neutre, alcool benzylique 30 mbar 2 s.

	Mobilité μ ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	moyenne
IFN γ	15,1	17,4	16,7	16,4
F1	15,2	15,3	12,3	14,3
F2	7,8	7,0	7,4	7,4
F3	15,5	13,4	14,8	14,6

Tableau 36 : Mobilités électrophorétiques obtenues pour les trois fractions d'oligosaccharides récoltées en HPLC.

Comme pour le spectre de la Figure 63, l'intensité absolue des ions ne dépasse pas 1000. En revanche, l'intensité des ions de l'IFN γ non liée est supérieure à ceux du complexe non covalent. Le couplage dans le mode ACE se révèle être plus délicat à mettre en œuvre en CE-MS. Le fait de ne pas observer de signal pour T11 ou O11 est peut être dû à des concentrations, voire des conditions d'ionisation à optimiser. Pour régler ce problème, d'autres expériences devront être mises en œuvre afin d'obtenir dans un premier temps un spectre de masse beaucoup plus intense pour l'homodimère de l'IFN γ . De plus une optimisation des paramètres de spectrométrie de masse devra être faite, voire également des paramètres d'électrophorèse capillaire (tampon, pH, modification du capillaire), ce qui n'a pu être réalisé, faute de temps.

Au vu des résultats obtenus, l'homodimère de l'IFN γ semble uniquement interagir avec une seule molécule d'oligosaccharide sulfaté de type héparine. Cependant, certains travaux ont mis en évidence que l'IFN γ interagit avec deux octasaccharides sulfatés de type HS reliés entre eux par un domaine N-acétylé (14 à 15 disaccharides) [407]. Les complexes d'ordre supérieurs, s'ils existent, peuvent être masqués dans le bruit de fond ou ne sont pas détectés dans nos conditions. Il se peut également que, même s'ils sont formés en ACE, les complexes d'ordre supérieur ne soient pas stables en phase gazeuse dans nos conditions d'analyses. L'optimisation des paramètres et des conditions d'analyse se révélera être une étape très importante. On pourrait également s'interroger sur la capacité de l'IFN γ à lier des oligosaccharides sulfatés de type HP, d'où une éventuelle absence de complexes d'ordre supérieur sur les spectres de masse réalisés.

V.5 Application à des échantillons biologiques

Une fois que l'optimisation ACE-MS aura été faite, la stratégie de « ligand fishing » pourra être réalisée sur des échantillons biologiques dans le but de déterminer le(s) ligand(s) impliqué(s) dans l'interaction avec l'IFN γ . Cette stratégie reposera à la fois sur la préparation des oligosaccharides interagissant avec l'IFN γ par chromatographie d'affinité et sur la capacité à identifier ces ligands par spectrométrie de masse *via* le couplage CE-MS.

L'Institut de Biologie Structurale a dans un premier temps effectué une séparation par chromatographie d'affinité. Un mélange inconnu d'octasaccharides contenant différentes structure d'HS a été introduit sur une colonne d'affinité greffée par le peptide C-terminal de l'IFN γ .

Cette procédure a permis de récolter trois fractions : F1, F2 et F3 où seule F2 est retenue sur la colonne d'affinité (Figure 67). Chaque fraction (5 μ L dans 45 μ L de tampon), dont la concentration est inconnue, a ensuite été étudiée au laboratoire par électrophorèse capillaire d'affinité. Trois séries ont été réalisées. Les électrophorégrammes obtenus pour l'une des séries sont présentés dans la Figure 68. Les mobilités électrophorétiques déterminées à partir des temps de migration des pics électrophorétiques sont regroupées dans le Tableau 36. Les fractions F1 et F3 conduisent à un léger décalage de la mobilité par rapport à l'IFN γ seule. En revanche, en présence de la fraction F2, la mobilité de l'IFN γ est environ 2,2 fois plus faible que pour la mobilité de l'IFN γ en absence d'oligosaccharides. L'analyse des fractions par ACE nous a donc permis de confirmer que la fraction F2 interagit bien avec l'IFN γ puisqu'elle provoque une baisse de la mobilité électrophorétique. La faible baisse de mobilité pour F1 et F3 pourrait être due à des interactions très faibles avec des oligosaccharides peu spécifiques. Cependant, l'ACE confirme les résultats observés par chromatographie d'affinité.

V.6 Conclusion et perspectives

Ce travail a permis pour la première fois de détecter l'homodimère d'IFN γ par spectrométrie de masse ESI couplée à l'électrophorèse capillaire, de même que des complexes non covalents en présence d'oligosaccharides de synthèse sulfatés. Cependant, les premiers essais ont soulevé une difficulté concernant la détection sensible de l'homodimère de l'IFN γ par spectrométrie de masse. Tous les complexes IFN γ /oligosaccharide de synthèse détectés sont de stœchiométrie 1/1 (un homodimère/un oligosaccharide). Ces résultats sont différents des données de la littérature qui concluent à une stœchiométrie 1/2 (un homodimère/2 octasaccharides de type HS) [407]. Une optimisation des paramètres de détection sera donc à mettre en œuvre afin d'obtenir le meilleur signal possible pour l'étude de ces complexes et permettra ou non de discuter ces stœchiométries différentes.

L'électrophorèse capillaire d'affinité s'est révélée être un atout pour la stratégie de « ligand fishing » qui est développée au laboratoire. La CE devrait être en mesure de séparer les complexes non covalents en fonction de leur rapport z/m , puis couplée à la spectrométrie de masse, la stœchiométrie des complexes et la structure des ligands oligosaccharidiques pourront être déterminés. Différents mélanges d'oligosaccharides, issus d'une dépolymérisation enzymatique, pourront être analysés par cette technique.

Comme pour SDF-1 α et MCP-1, une détermination des constantes de dissociation est à envisager pour l'interaction de l'homodimère de l'IFN γ avec différents oligosaccharides synthétiques sulfatés de synthèse (de type HP ou HS) afin d'obtenir des informations sur l'influence de la taille de l'oligosaccharide et les modifications des positions des groupements sulfate sur la force d'interaction IFN γ /oligosaccharide de synthèse.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'étude des complexes protéines / glycosaminoglycanes (GAGs) est dans la majorité des cas réalisée par résonance magnétique nucléaire et rayons X. Cependant, d'autres techniques, apportant d'autres données, permettent également ces caractérisations ; c'est le cas de l'électrophorèse capillaire (CE) et de la spectrométrie de masse (MS). Dans le cadre de cette thèse, l'étude des interactions protéines / GAGs a été réalisée à l'aide du couplage de ces deux techniques (CE-MS). Cette méthode avait préalablement été développée au laboratoire pour caractériser les complexes ATIII/oligosaccharides d'héparine et chimiokines/oligosaccharides d'héparine.

Une partie de ces travaux a tout d'abord été consacrée à l'étude de l'interaction entre une protéine membre de la famille des cytokines chimioattractantes (SDF-1 α) et des oligosaccharides sulfatés **de synthèse** de type héparine de structure connue. L'objectif était d'étudier l'influence du nombre et de la position des groupements sulfate portés par l'oligosaccharide sur l'interaction avec la protéine SDF-1 α par ACE. Cette étude a permis pour la première fois de mettre en évidence l'impact de la position des groupements sulfate sur l'interaction. En effet, depuis que les interactions des chimiokines avec les GAGs sont étudiées, deux hypothèses sont défendues dans la littérature : l'une privilégie la position des groupements sulfate sur l'interaction alors que l'autre considère uniquement leur nombre. A l'heure actuelle et d'après les données de la littérature, la séquence idéale de l'héparine requise pour une interaction efficace présente entre 12 et 14 unités monosaccharidiques [254]. Cette information est cohérente avec notre conclusion qui indique que l'augmentation de la taille de l'oligosaccharide renforce l'interaction avec SDF-1 α . Certains travaux [254] précisent que les groupements 2-O- et N-sulfate sont nécessaires à l'interaction de l'héparine avec la chimiokine SDF-1 α et que le groupement 6-O-sulfate est moins impliqué dans l'interaction. Basés sur des tetrasaccharides sulfatés de synthèse de type héparine, nos résultats apportent une précision sur la position de ces groupements au sein de la séquence du GAG. Le groupement 2-O-sulfate est nécessaire du côté réducteur du tetrasaccharide et le groupement 6-O-sulfate n'est pas nécessaire du côté réducteur mais il l'est du côté non réducteur. Afin d'apporter d'autres données, il serait judicieux d'étudier les effets de la position des groupements N-sulfate sur l'interaction SDF-1 α /héparine et de transposer la modification de la position des groupements sulfate à des oligosaccharides de taille supérieure. Cependant, la synthèse de ces oligosaccharides n'est pas encore totalement maîtrisée. L'étude par ACE-MS a également été réalisée afin d'obtenir des données quant à la stœchiométrie des complexes non covalents formés. Cette étude a

confirmé les stœchiométries observées à l'aide d'autres techniques d'analyses, et nous a permis de déterminer une relation structure-activité de liaison SDF-1 α / oligosaccharides de synthèse.

La seconde partie de ces travaux avait pour but l'étude de l'interaction d'une autre chimiokine (MCP-1) en présence des mêmes oligosaccharides sulfatés de synthèse que pour SDF-1 α . De la même façon, les résultats obtenus nous ont permis de démontrer une influence de la position et du nombre des groupements sulfate par ACE et de construire une relation structure-activité de liaison. De plus, ces résultats ont mis en évidence que, bien qu'elles appartiennent à la même famille de chimiokines, les deux protéines ne réagissent pas de la même façon en présence des oligosaccharides. Cela montre donc que la structure des deux partenaires (protéine et GAG) est importante pour la formation des complexes. Contrairement à SDF-1 α , il existe moins de données dans la littérature concernant la séquence idéale de l'héparine. Il a été montré que MCP-1 interagit préférentiellement avec un octasaccharide d'héparine 11 à 12 fois sulfaté [359], ce qui confirme également que l'augmentation de la taille favorise l'interaction. L'étude de l'octasaccharide d'héparine 11SO₃ [478] révèle que les groupements 2-O- et N-sulfate ont une grande importance dans l'interaction avec MCP-1 contrairement au groupement 6-O-sulfate. De même, une étude a démontré que le groupement 3-O-sulfate de la glucosamine (rare sulfatation) n'est pas le facteur clé de l'interaction [479]. Nos résultats apportent une précision, à savoir que les groupements 2-O- et 6-O-sulfate sont nécessaires du côté réducteur du tetrasaccharide. Contrairement à SDF-1 α , le groupement 6-O-sulfate du côté non réducteur est également nécessaire.

Ces deux premières parties ont été réalisées avec des GAGs dont la structure est parfaitement maîtrisée. Cependant, les GAGs *in vivo* constituent un mélange très hétérogène rendant les analyses très complexes. Dans le but d'améliorer les analyses en présence d'échantillons biologiques, une stratégie de « ligand fishing » est développée au laboratoire. La dernière partie de cette thèse a été consacrée à l'étude d'une cytokine, l'interféron gamma humain (IFN γ) par CE, CE-MS et ACE-MS. L'IFN γ est une cible thérapeutique d'un grand intérêt biologique et l'objectif principal est de caractériser le(s) ligand(s) de cette protéine. L'analyse par spectrométrie de masse de l'IFN γ a été réalisée pour la première fois dans les conditions dites « natives ». Tout comme les protéines SDF-1 α et MCP-1, l'IFN γ a été étudié en présence d'oligosaccharides synthétiques afin d'apporter des informations sur la stœchiométrie des complexes non covalents formés, mais également pour optimiser la méthode utilisée qui sera la base de la stratégie de « ligand fishing ». Un échantillon biologique, issu d'une chromatographie d'affinité, a également été analysé par ACE en présence de l'IFN γ . Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence la capacité

de l'IFN γ à interagir avec un mélange de GAGs de composition et structure inconnues. La prochaine étape de ce travail consistera à mettre en œuvre le couplage CE-MS en présence d'un échantillon biologique dans le but de caractériser le(s) ligand(s) ayant le plus d'affinité pour l'IFN γ .

D'un point de vue analytique, la CE-MS apparaît comme une méthode puissante qui pourrait simplifier considérablement l'identification des ligands pour différentes protéines d'intérêt thérapeutique. D'un point de vue biologique, des analyses complémentaires s'avèrent nécessaires afin de relier les effets structuraux des GAGs à l'activité biologique des chimiokines. De même, le couplage CE-MS, ainsi que les progrès réalisés dans le domaine de la chimie des sucres, ouvrent la voie à de nombreux champs de recherche en ce qui concerne les interactions protéines / GAGs. Comprendre les mécanismes mis en jeu au cours de ces interactions permettra probablement de mettre au point des molécules médicamenteuses afin de contrer les processus pathologiques.

Il reste cependant une limite à notre travail. Nous avons seulement testé l'influence de la position des groupements sulfate sur la séquence et non l'organisation en domaines de celles-ci le long de la chaîne sulfatée. Chaque protéine aurait aussi une structure en domaines bien précise pour une interaction optimale. Nous pouvons citer par exemple l'IFN γ pour lequel une structure en domaine idéale est proposée : deux domaines N-sulfatés de 6 à 8 monosaccharides de type HS séparés par un domaine central N-acétylé (environ 7kDa) [407]. Dans notre cas, ces informations amènent à envisager de nombreuses perspectives quant à la détermination des séquences en domaines des GAGs pour l'interaction des protéines SDF-1 α et MCP-1 avec les GAGs.

MATERIEL

VI.1 Appareillage

L'appareil d'électrophorèse capillaire utilisé est un HP^{3D}CE commercialisé par Agilent technologies. Un cryothermostat LAUDA RE104 permet de réguler la température de la plaque tournante (carrousel) portant les flacons contenant les échantillons. Le logiciel permettant l'acquisition et le traitement des données est le ChemStation Agilent version A.09.03.

Le spectromètre de masse utilisé est un Esquire 3000+ commercialisé par Bruker Daltonics (Figure 69). Ce spectromètre est composé d'une source électrospray et d'un analyseur à trappe ionique quadripolaire. Le logiciel permettant l'acquisition et le traitement des données est le Bruker Daltonic DataAnalysis version 5.1. Les paramètres de tension de sortie du capillaire et de focalisation des lentilles ont été choisis par l'intermédiaire d'un réglage semi-automatique de la "masse cible", correspondant à la valeur du rapport m/z de l'ion d'intérêt. Deux gammes de masse de travail sont disponibles : mode normal (50 à 3000 m/z) et mode étendu (200 à 6000 m/z).

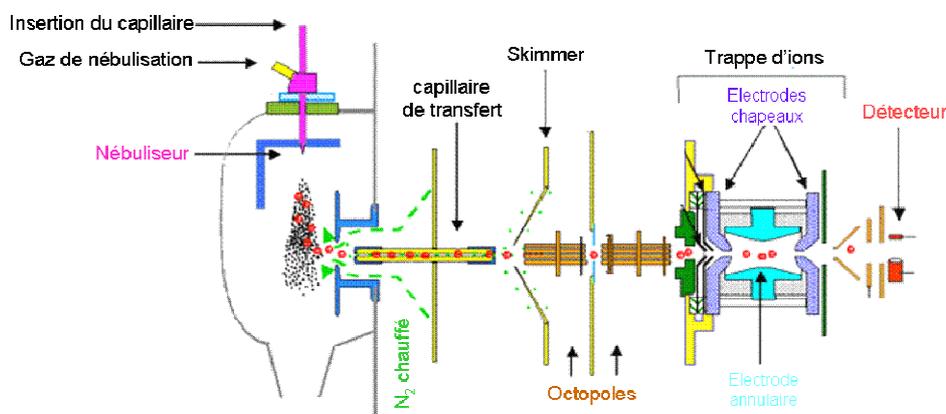


Figure 69 : Représentation schématique du spectromètre de masse Esquire 3000+ (Bruker Daltonics©)

Le couplage CE-MS a été réalisé au moyen d'une interface coaxiale à 3 voies (G1607A, Agilent Technologies). Le liquide additionnel est apporté à l'aide d'un pousse seringue 74 900 séries (Cole-Palmer, USA). La position du capillaire d'électrophorèse dans le nébuliseur doit être optimisée de façon très précise au moyen d'une vis micrométrique.

Toutes les conditions expérimentales utilisées en CE, MS et CE-MS sont détaillées dans les légendes des figures présentant les résultats.

VI.2 Produits

VI.2.1 La chimiokine SDF1 α

Cette protéine recombinante (Figure 70) a été fournie par PeproTech France. Vendue lyophilisée, la protéine a été reprise dans de l'eau, à 75 μ M, puis aliquotée et conservée à -80°C. La protéine a ensuite été diluée pour les analyses dans l'électrolyte de séparation : acétate d'ammonium pH 6,5 à 75 mM (Fluka Analytical, pureté \geq 99,0% pour spectrométrie de masse) à 15 μ M. Une description générale de la protéine est présentée page 78 de ce manuscrit.

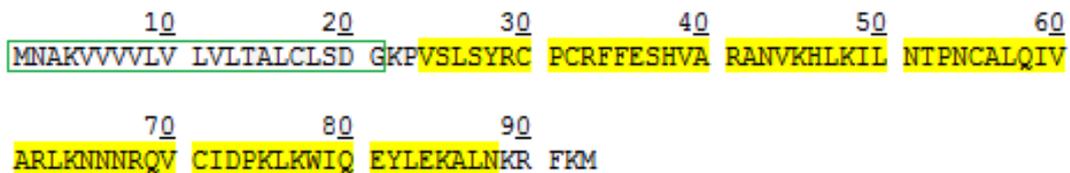


Figure 70 : Séquence de la protéine SDF-1 α humaine.

(Vert) Peptide signal, (Jaune) Séquence de l'isoforme SDF-1 α . (Source : Swiss-Prot)

VI.2.2 La chimiokine MCP-1

Cette protéine recombinante (Figure 71) a été fournie par PeproTech France. Vendue lyophilisée, la protéine a été reprise dans l'électrolyte de séparation, à 15 μ M, puis conservée à 4°C pendant 3 à 4 jours. Cette protéine ne doit pas être congelée une fois mise en solution. Une description générale de la protéine est présentée page 86 de ce manuscrit.

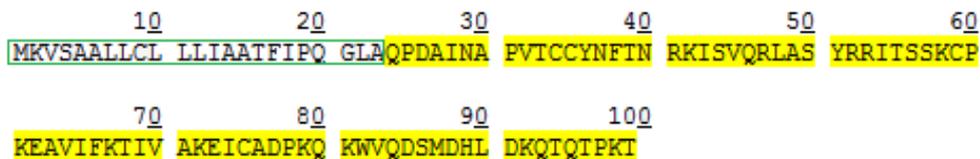


Figure 71 : Séquence de la protéine MCP-1 humaine.

(Vert) Peptide signal, (Jaune) Séquence de la chimiokine MCP-1. (Source : Swiss-Prot)

VI.2.3 L'interféron gamma humain

Cette protéine recombinante a été fournie généreusement par le laboratoire « Structure et Activité des Glycosaminoglycanes » dirigé par le Dr. Hugues Lortat-Jacob (Institut de Biologie Structurale, Grenoble). L'interféron gamma humain (IFN γ) est un homodimère naturel. La protéine est donc formée par deux polypeptides ayant chacun la séquence présentée dans la Figure 72. Les échantillons sont à une concentration de 75 μ M dans l'eau. Une description générale de la protéine est présentée page 92 de ce manuscrit.

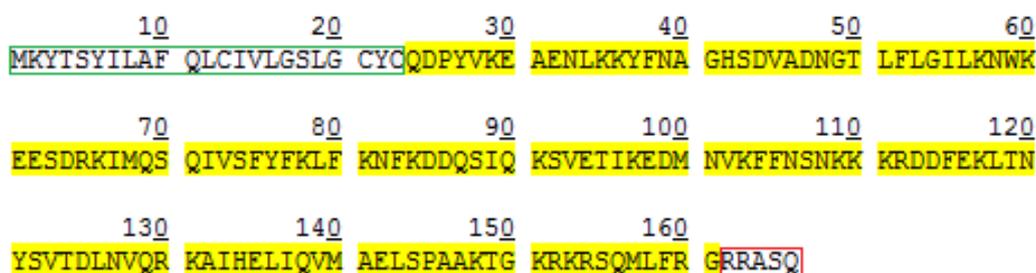


Figure 72 : Séquence de l'interféron gamma humain (IFN γ).

(Vert) Peptide signal, (Jaune) Séquence en acides aminés de l'interféron gamma, (Rouge) Propeptide.

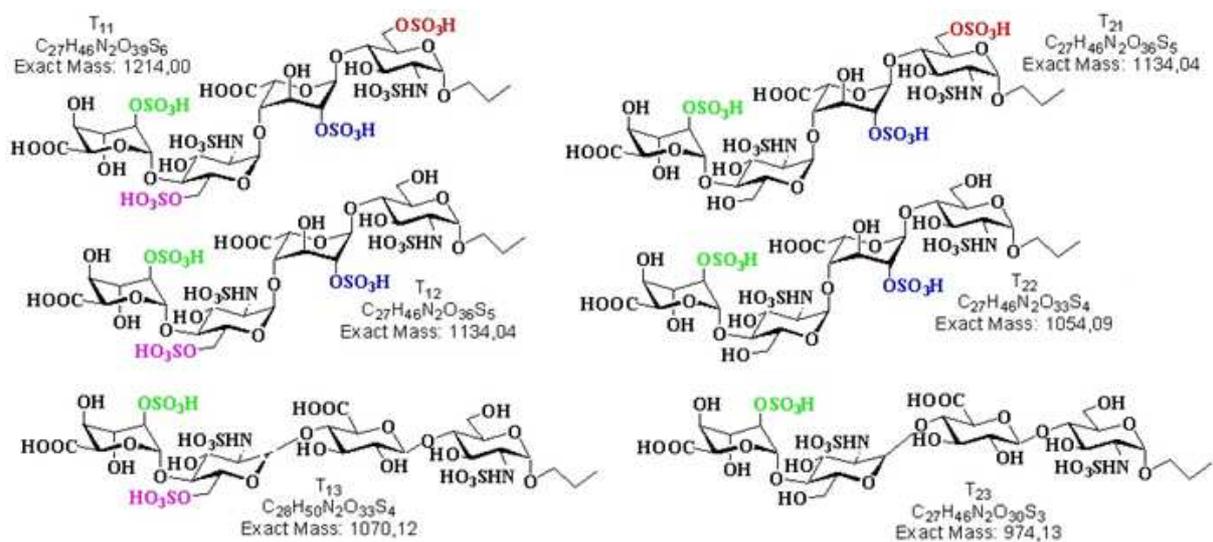
VI.2.4 Oligosaccharides de synthèse sulfatés de type HP

Une bibliothèque de 6 tetrasaccharides, un hexasaccharide et un octasaccharide de synthèse de type HP nous ont généreusement été donnés par le Pr. David Bonnaffé du Laboratoire de Chimie Organique Multifonctionnelle (Orsay, UMR 8182).

Chaque oligosaccharide a été aliquoté dans l'eau puis conservé à une température de -80°C. Les gammes de concentration sont réalisées par dilutions successives dans l'électrolyte de séparation (acétate d'ammonium 75 mM, pH 6,5). Pour les analyses, un volume de 40 μ L minimum doit être mis dans les vials.

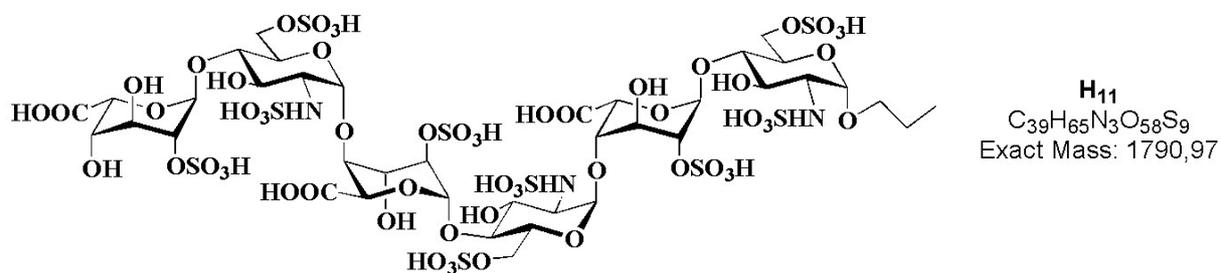
La structure des tetrasaccharides (Figure 31) et de l'hexasaccharide (Figure 32) est décrite dans le chapitre 3 (SDF-1 α). Ils ont été synthétisés avec des structures caractéristiques des différents disaccharides de l'héparine (Tableau 2). Les tetrasaccharides diffèrent au niveau du degré de sulfatation et/ou de la position des groupements sulfates.

L'octasaccharide (Figure 64) est présenté dans le chapitre 5 (IFN γ).

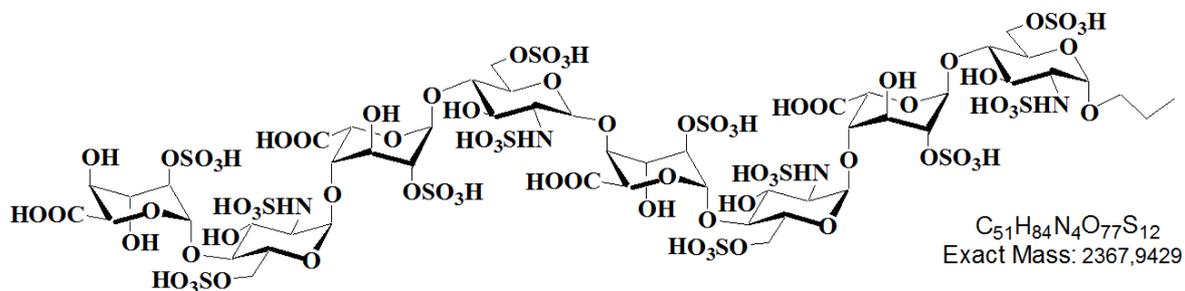


Rappel de la Figure 31 : Structure des oligosaccharides sulfatés de synthèse utilisés.

Les couleurs verte, violette, bleue et rouge représentent les groupements sulfate présents ou non dans la structure du tetrasaccharide.



Rappel de la Figure 32 : Structure de l'hexasaccharide de synthèse H11.

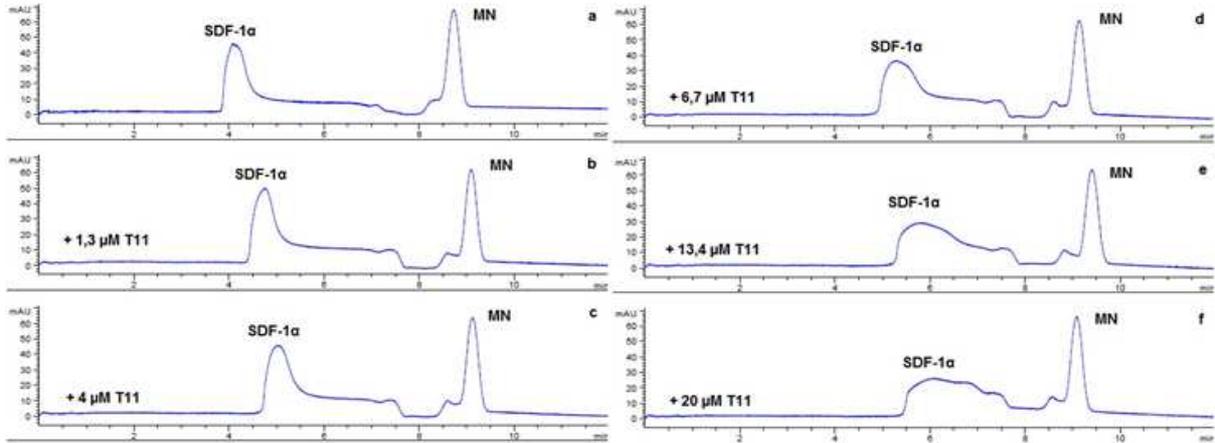


Rappel de la Figure 64 : Structure de l'oligosaccharide de synthèse dodecasulfaté O11.

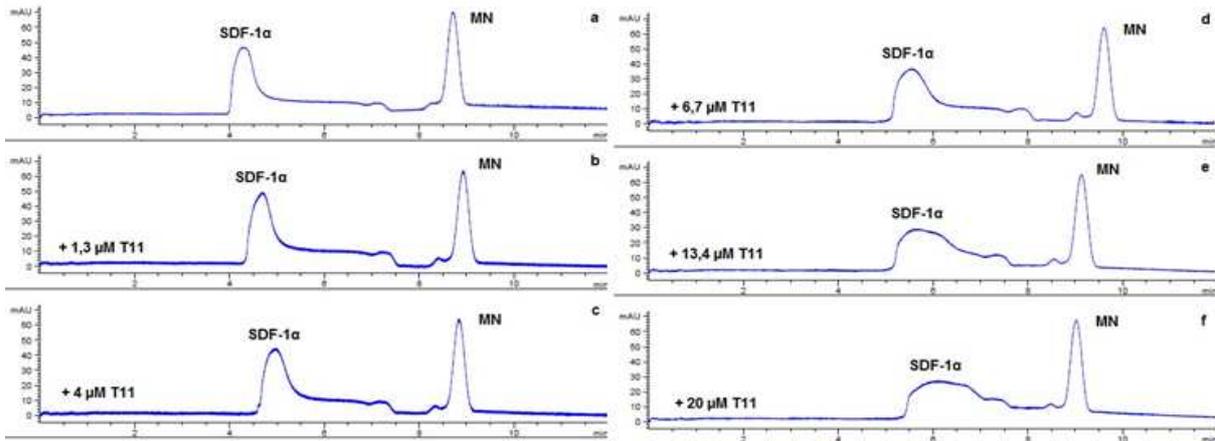
ANNEXES

Annexe 1 : Electrophorogrammes en présence de T11.

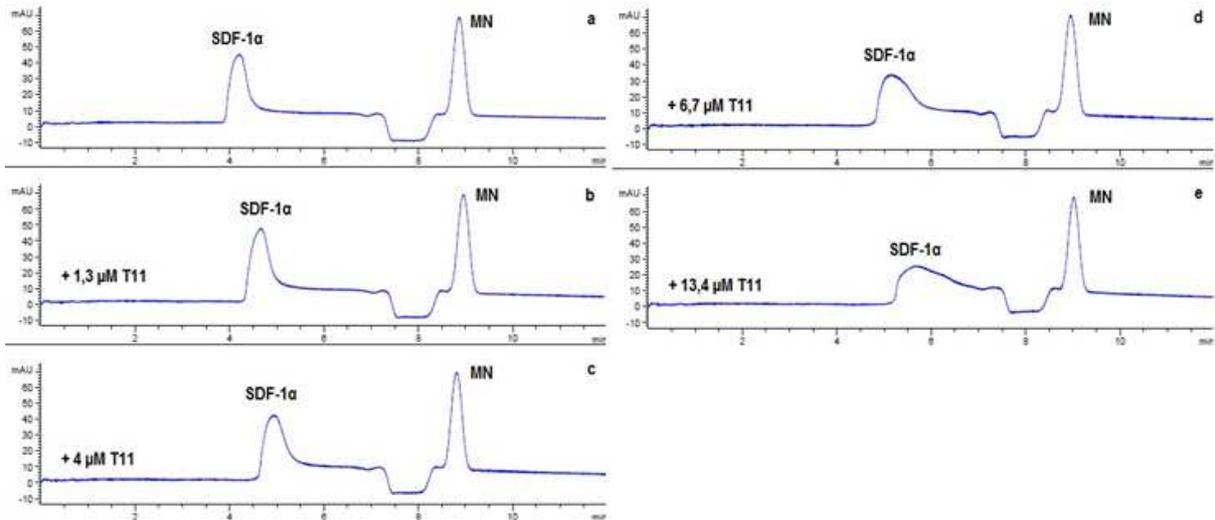
Série 2



Série 3

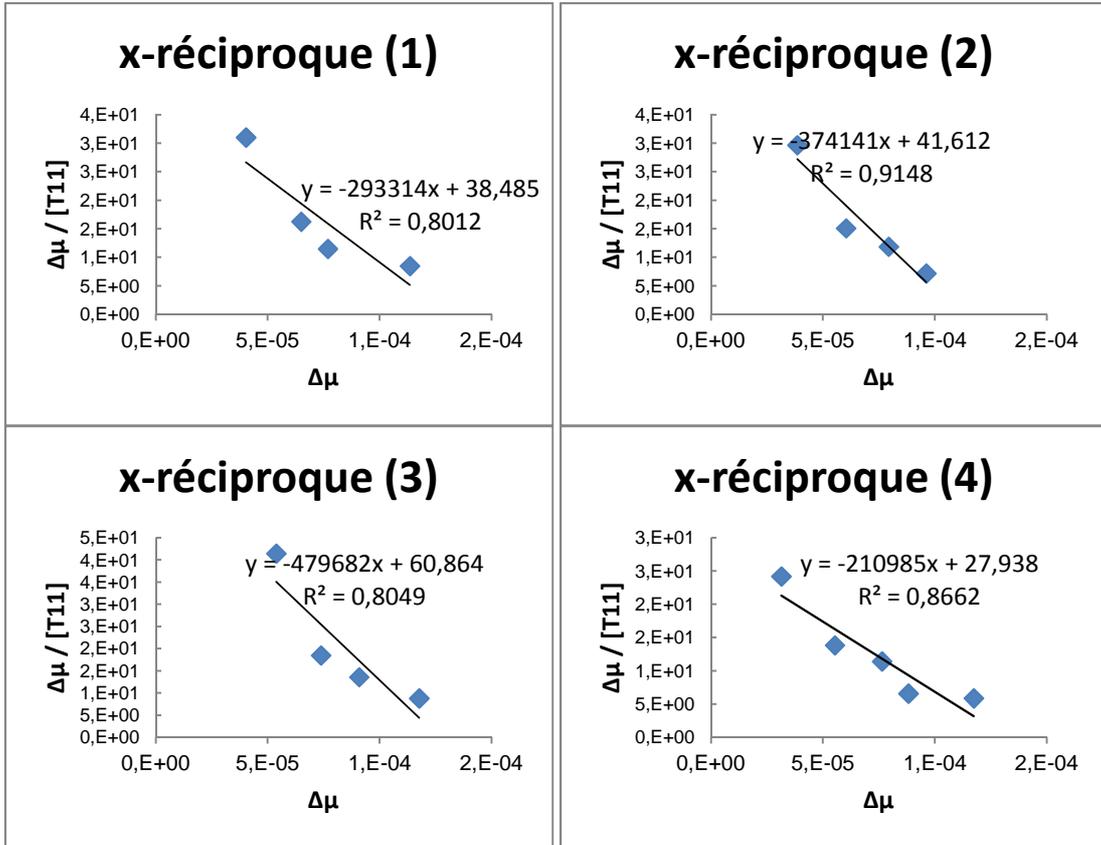


Série 4

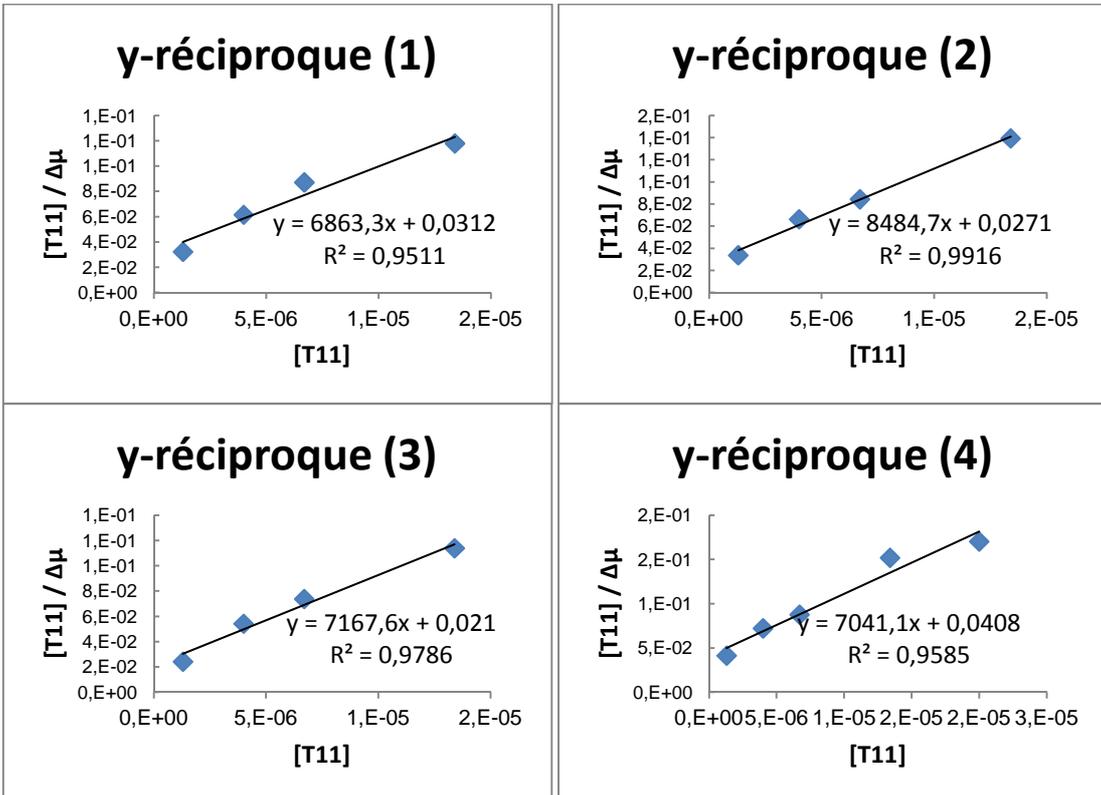


Annexe 2 : Linéarisation

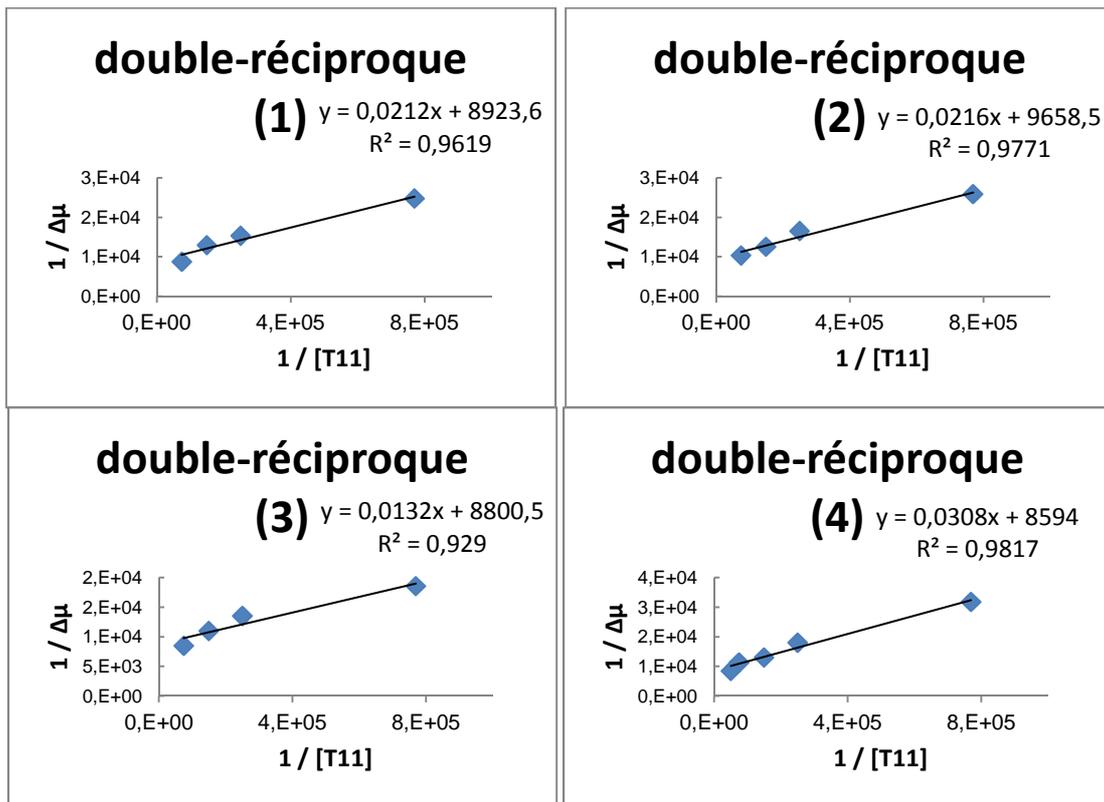
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque

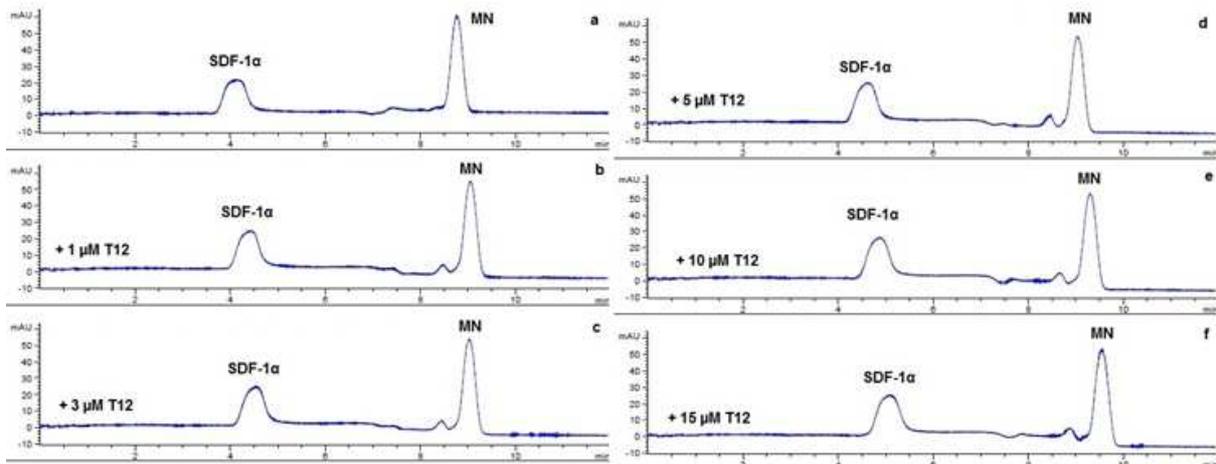


Méthode double-réciproque

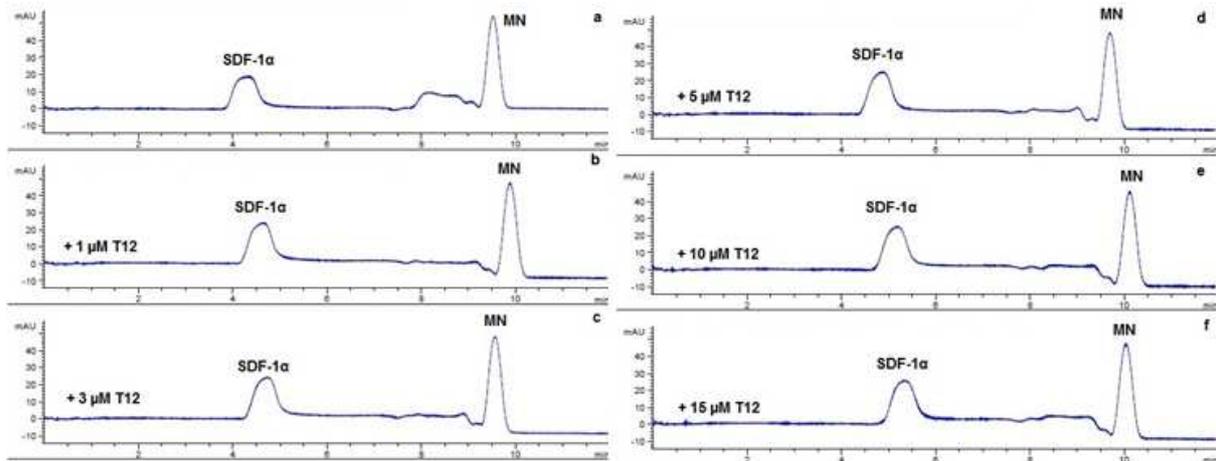


Annexe 3 : Electrophorégrammes en présence de T12

Série 2

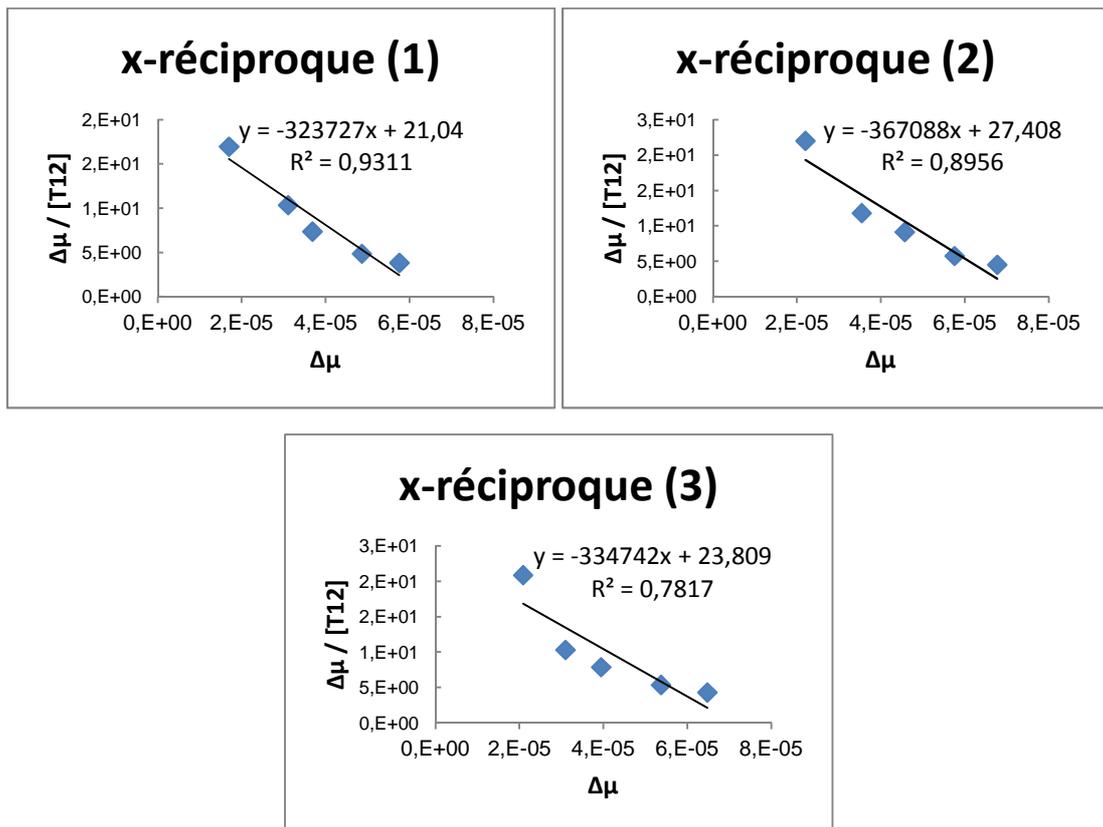


Série 3

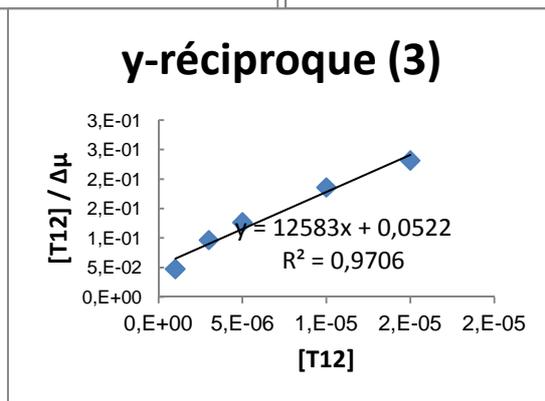
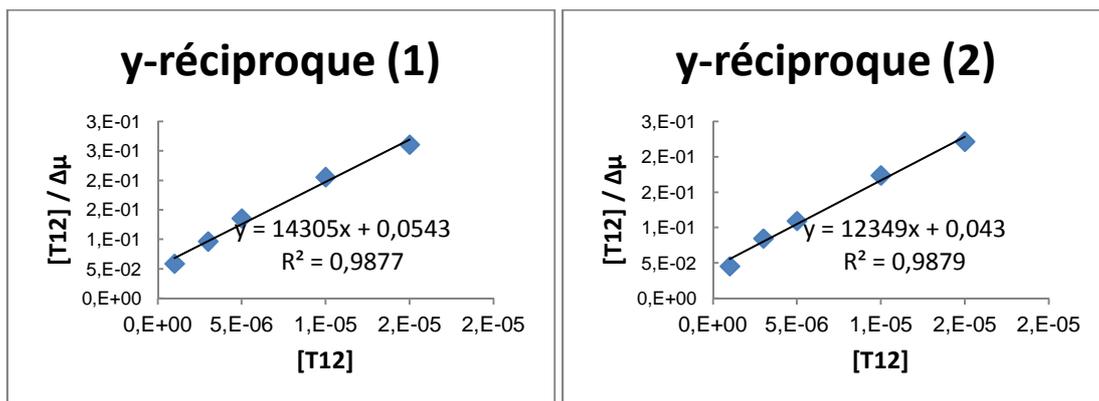


Annexe 4 : Linéarisation

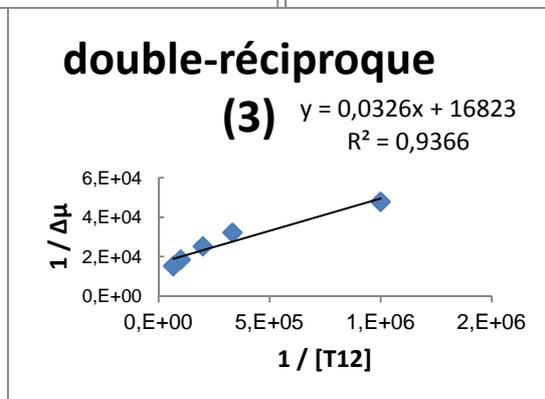
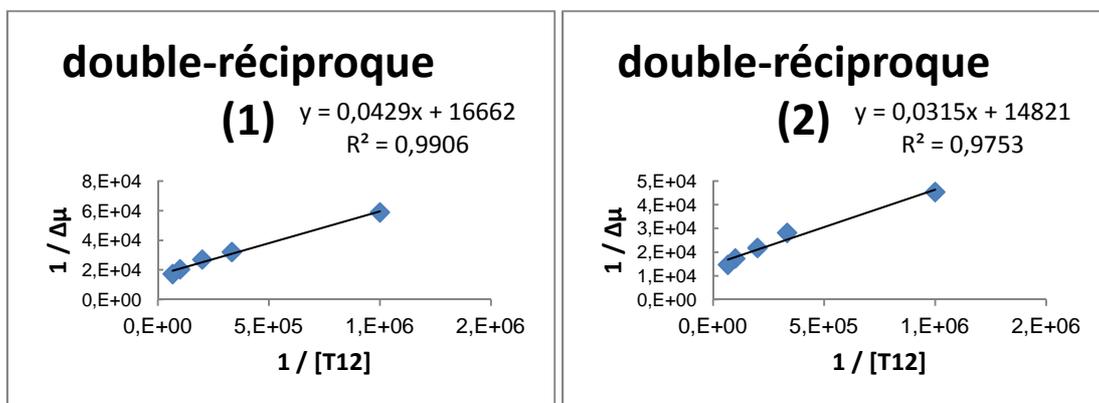
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque

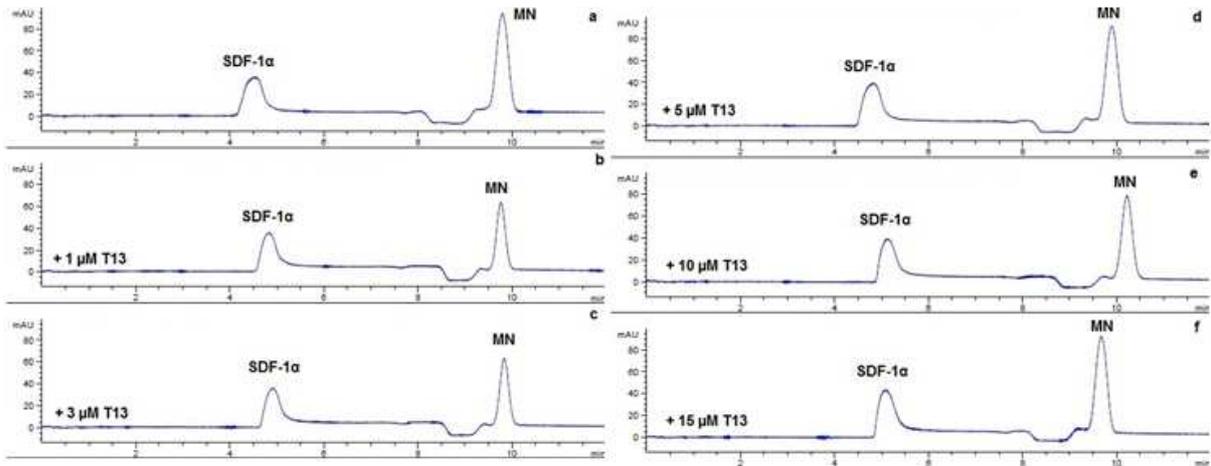


Méthode double-réciproque

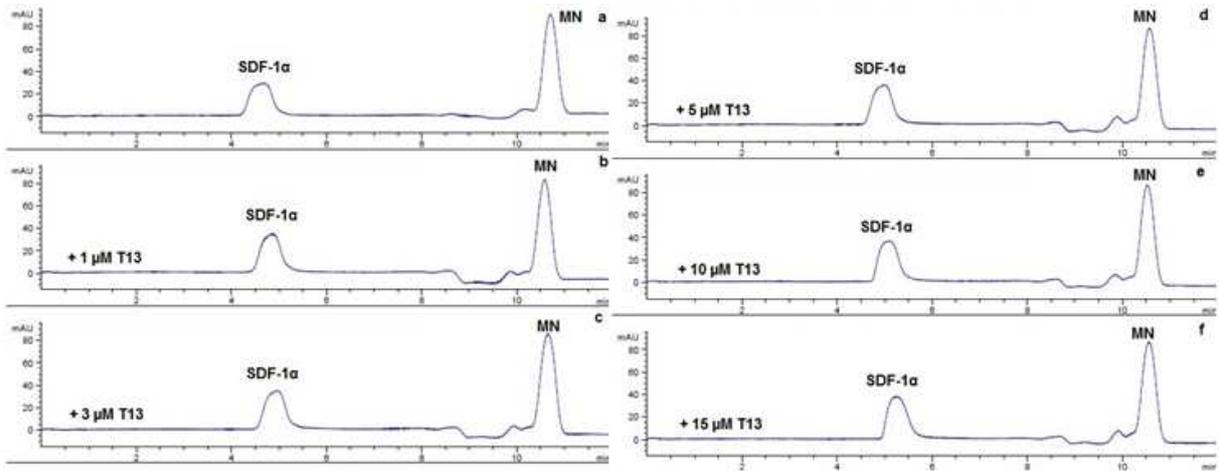


Annexe 5 : Electrophorégrammes en présence de T13

Série 2

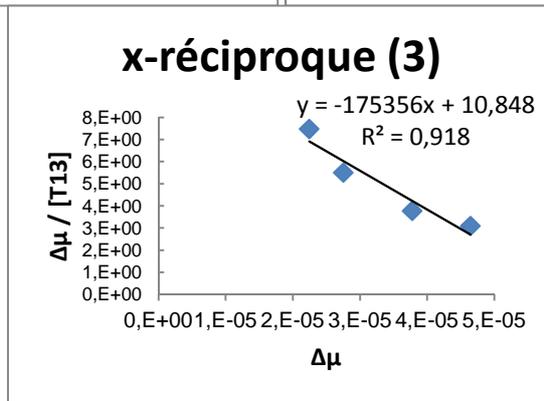
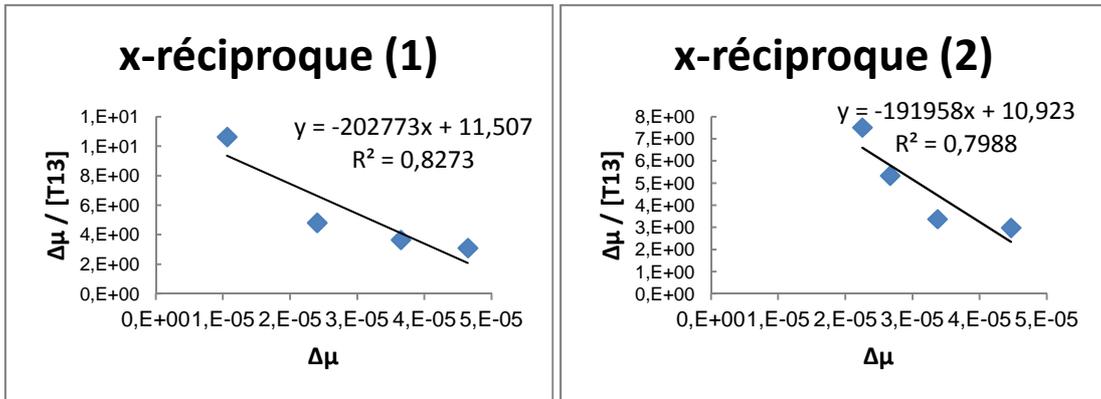


Série 3

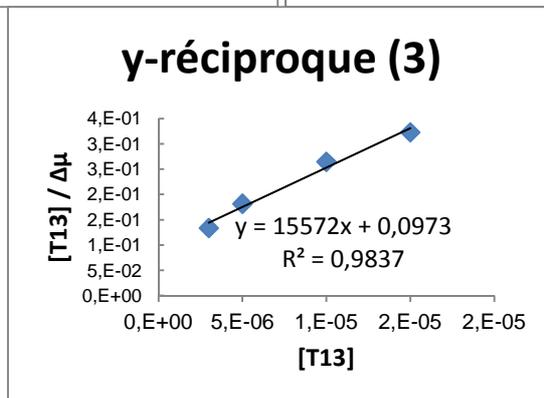
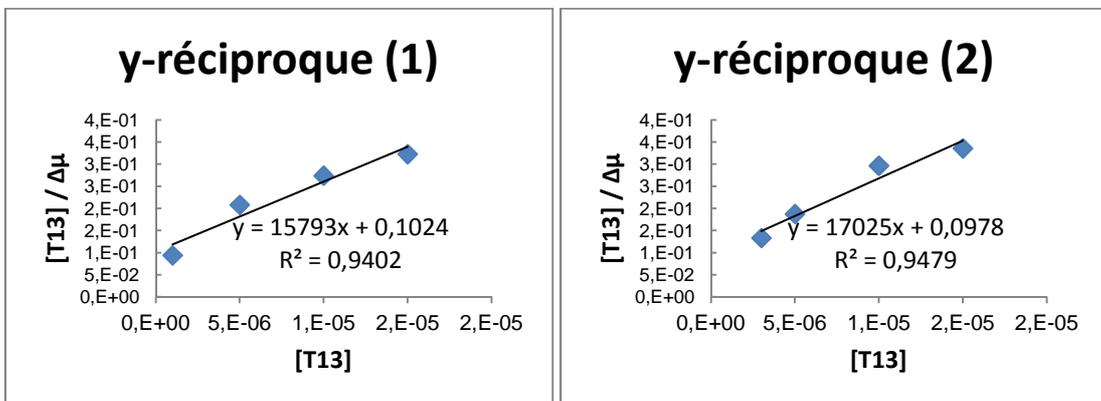


Annexe 6 : Linéarisation

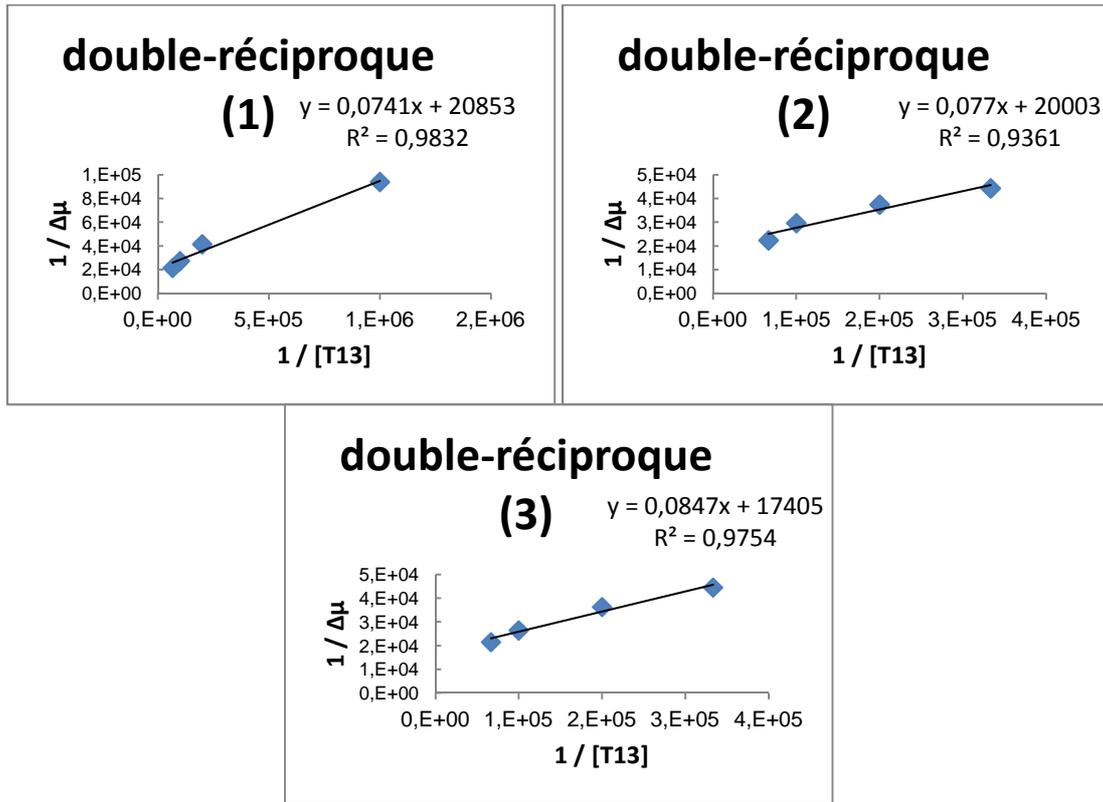
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque

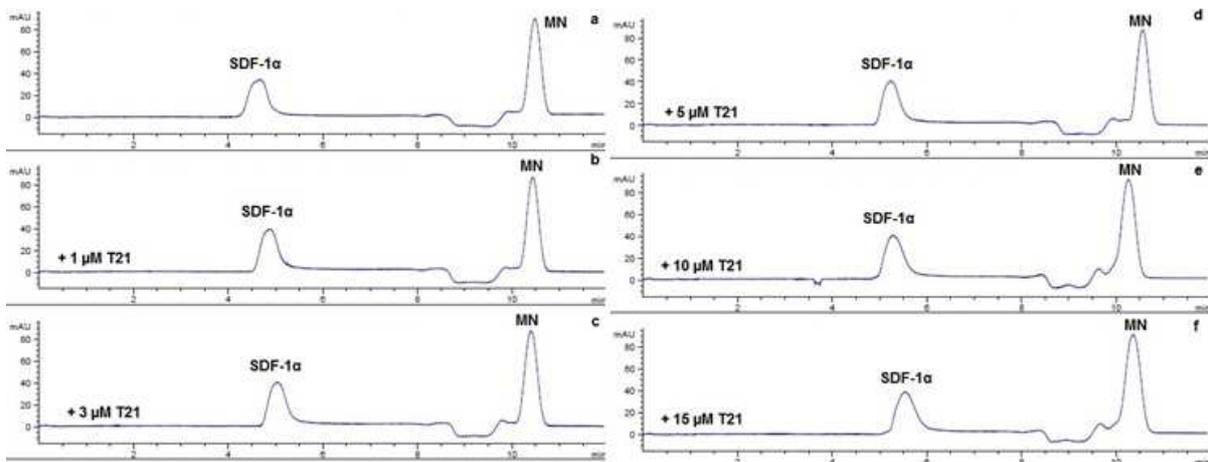


Méthode double-réciproque

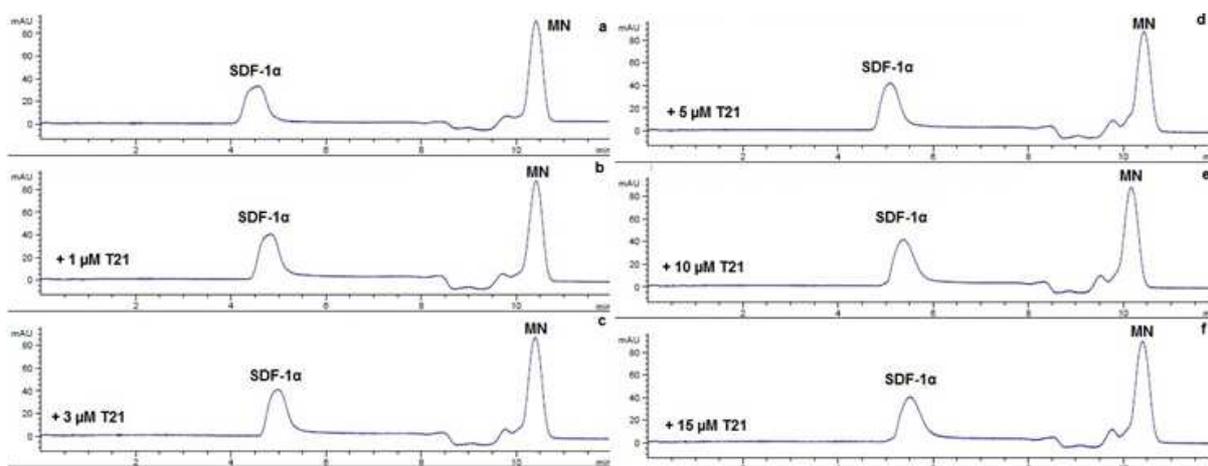


Annexe 7 : Electrophorégrammes en présence de T21

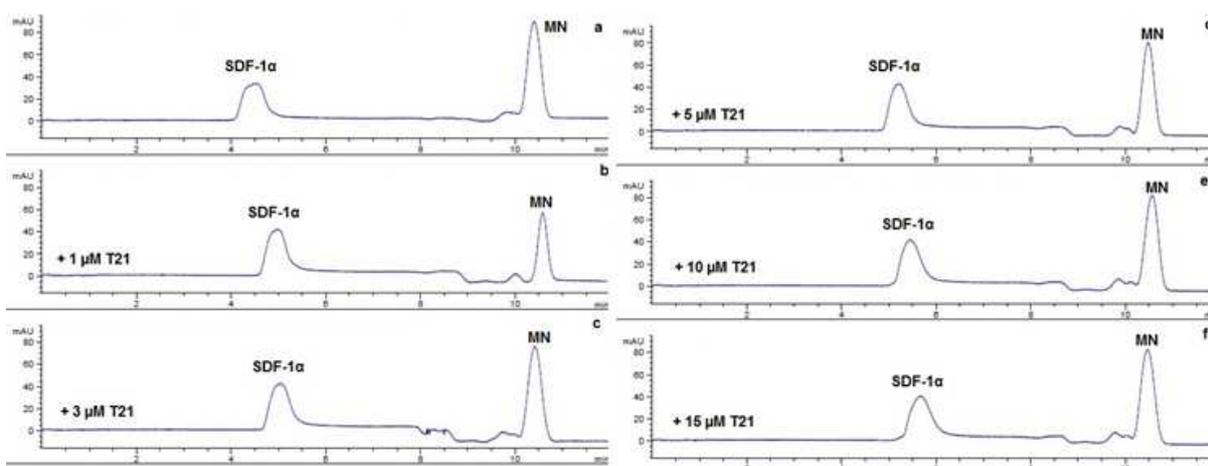
Série 2



Série 3

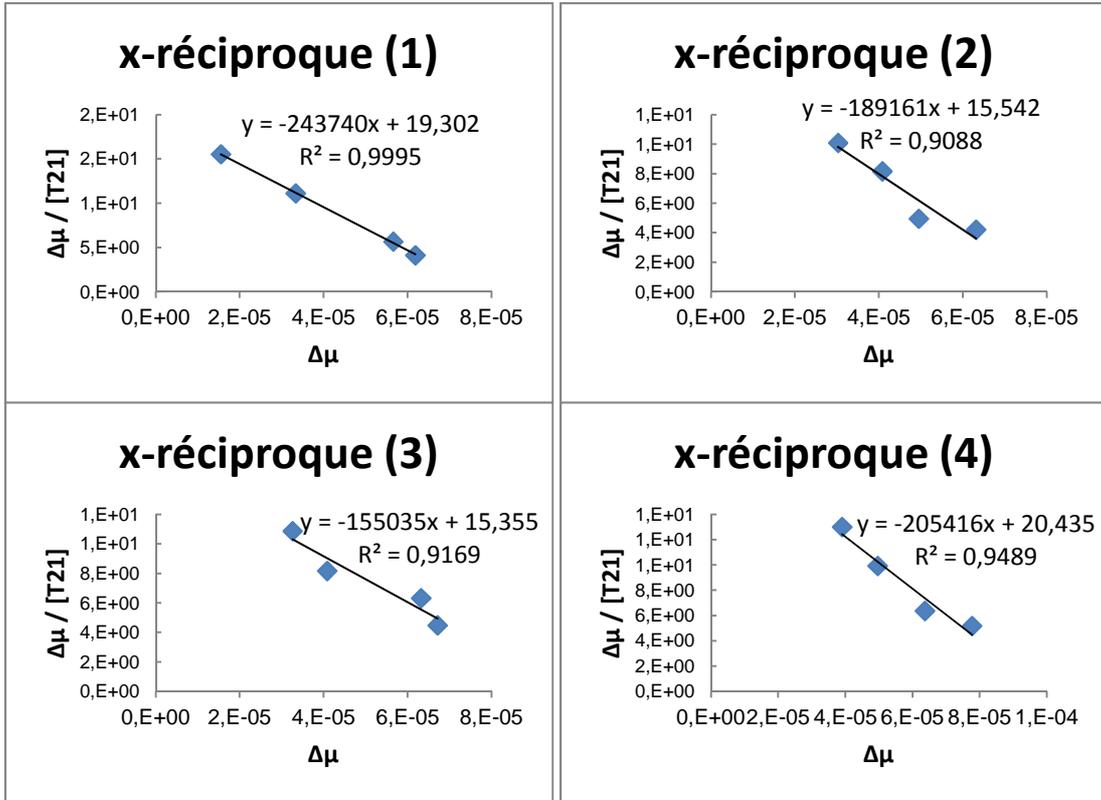


Série 4

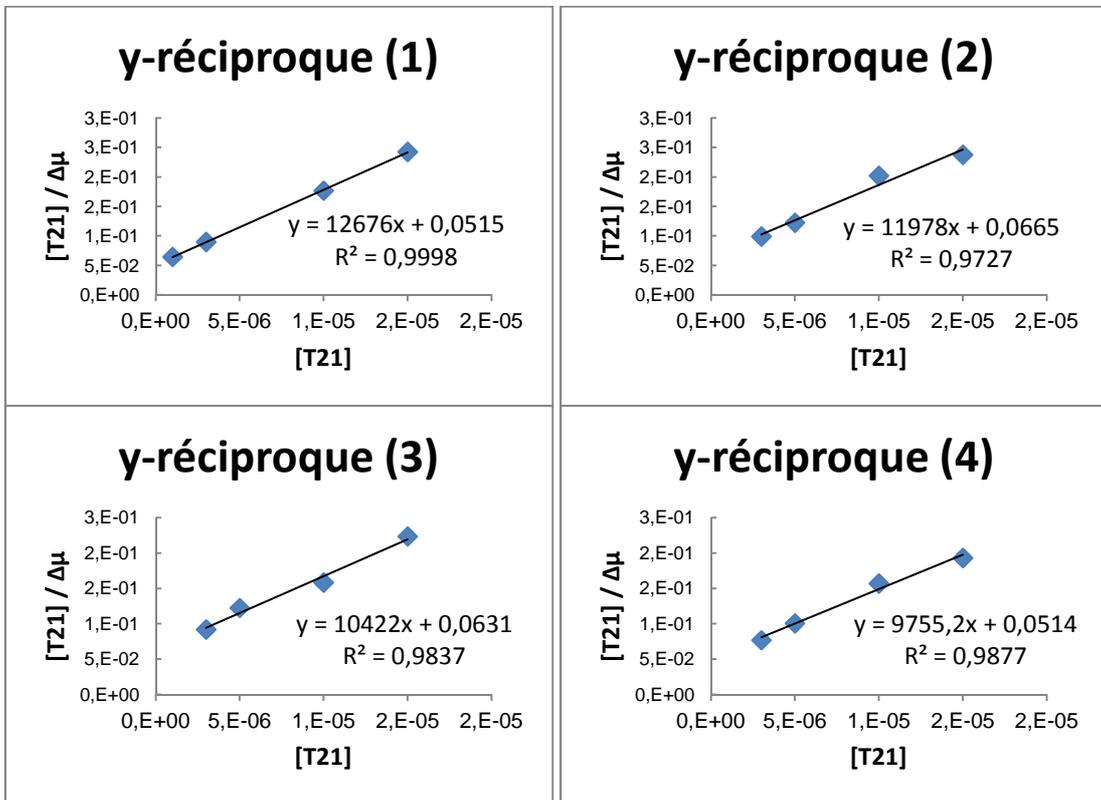


Annexe 8 : Linéarisation

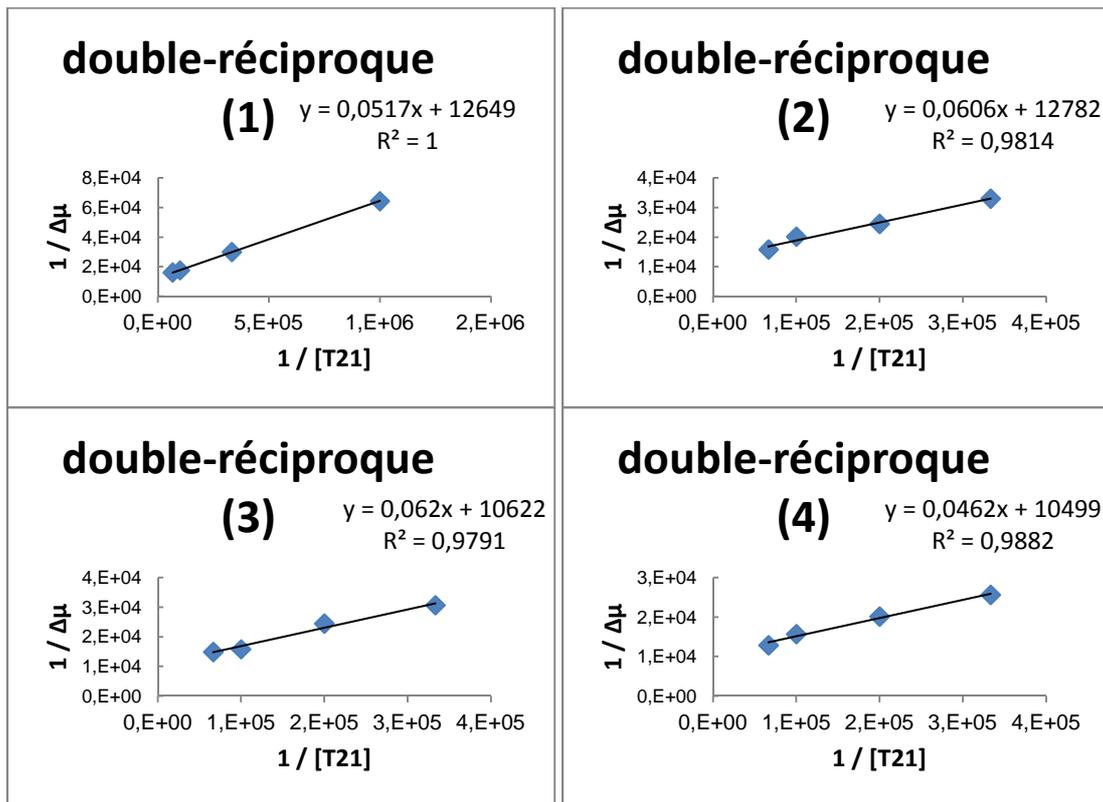
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque

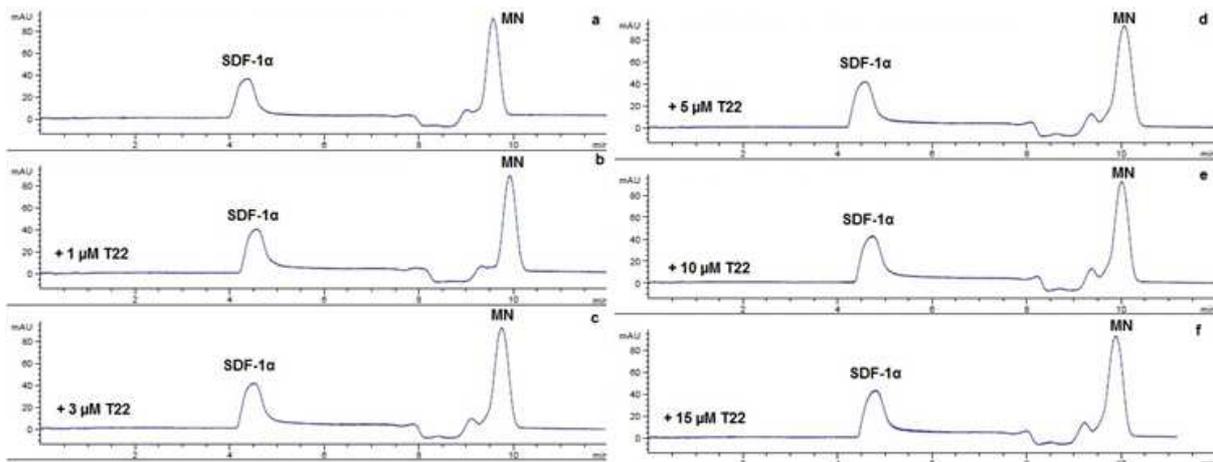


Méthode double-réciproque

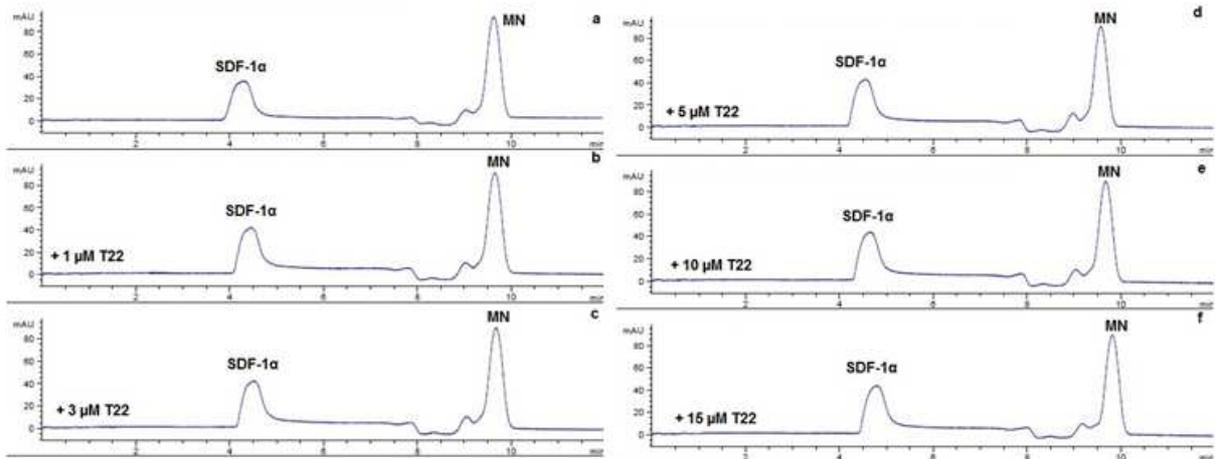


Annexe 9 : Electrophorégrammes en présence de T22

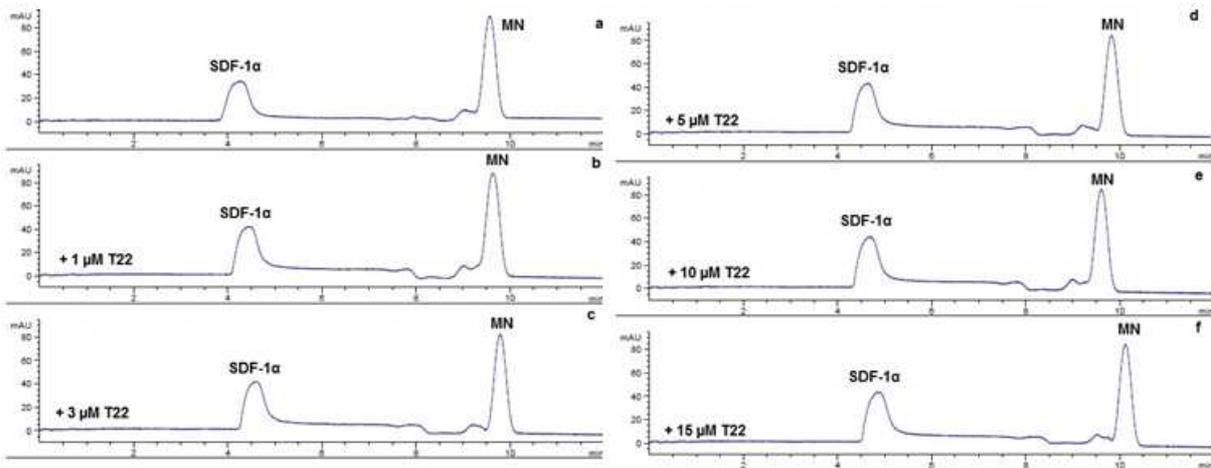
Série 2



Série 3

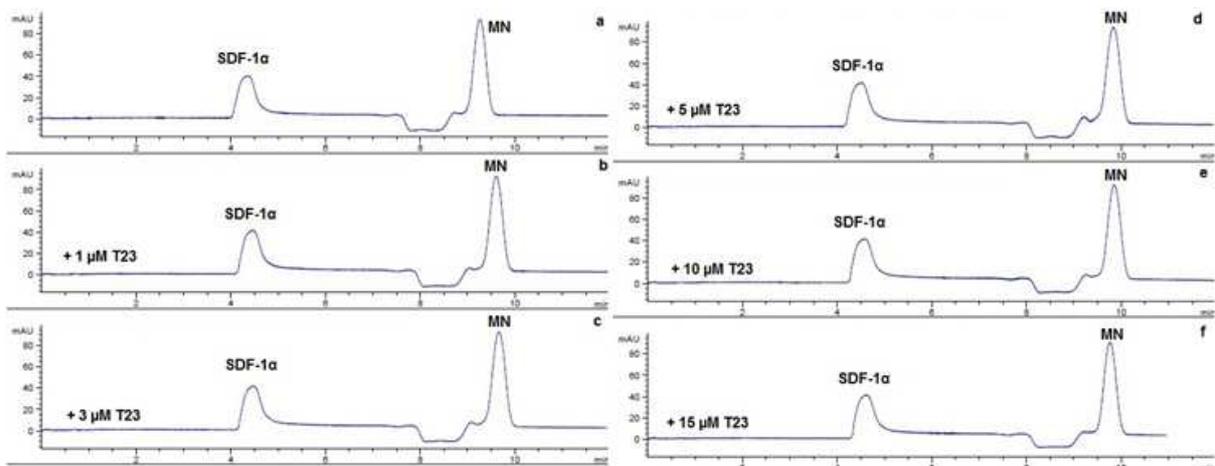


Série 4

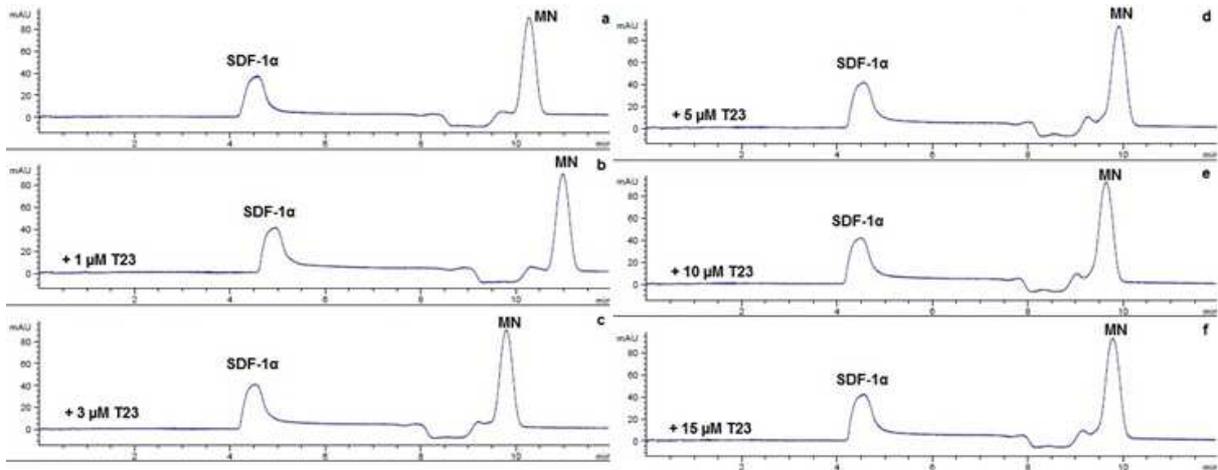


Annexe 10 : Electrophorégrammes en présence de T23

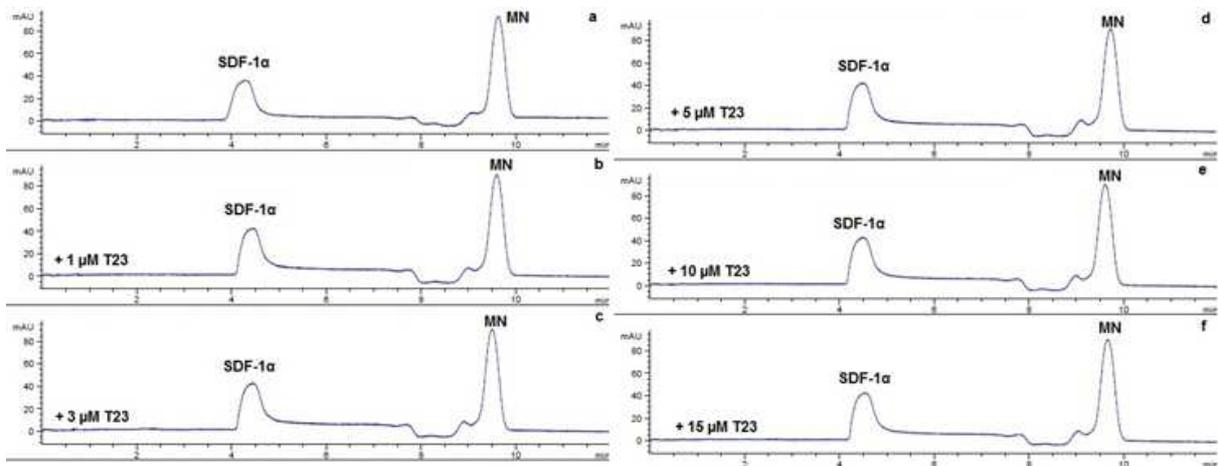
Série 1



Série 2

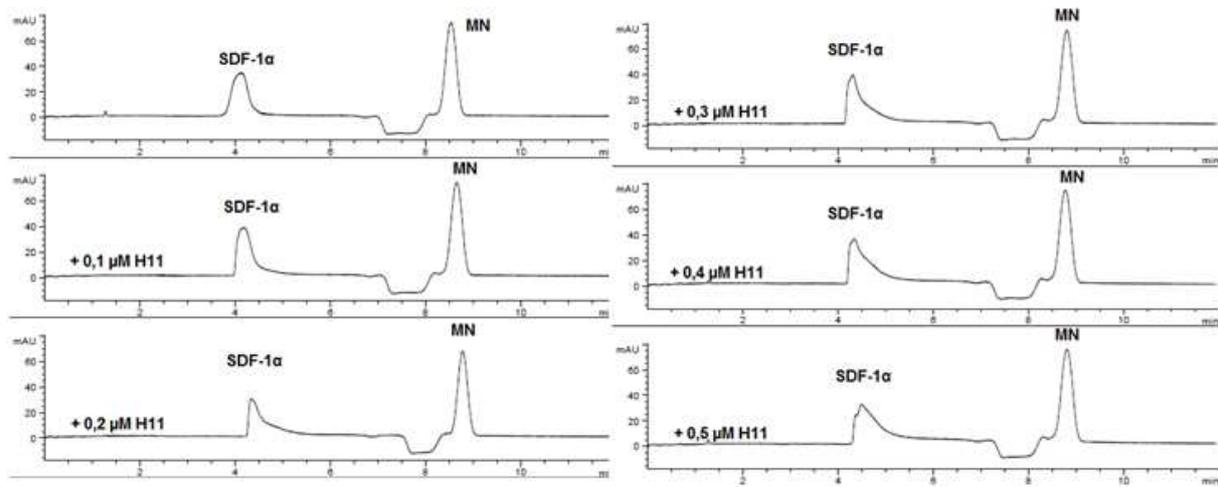


Série 3

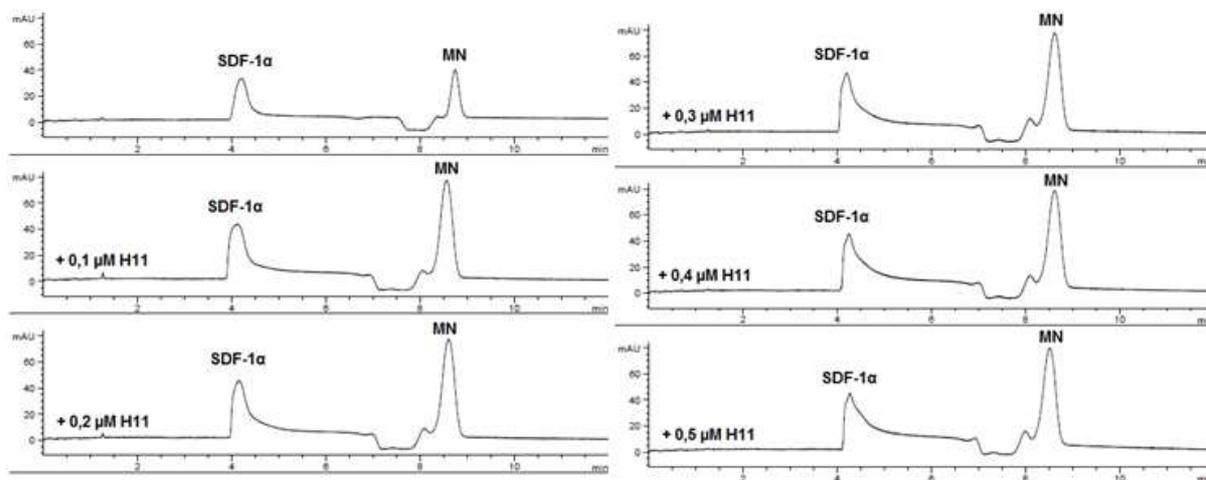


Annexe 11 : Electrophorégrammes en présence de H11

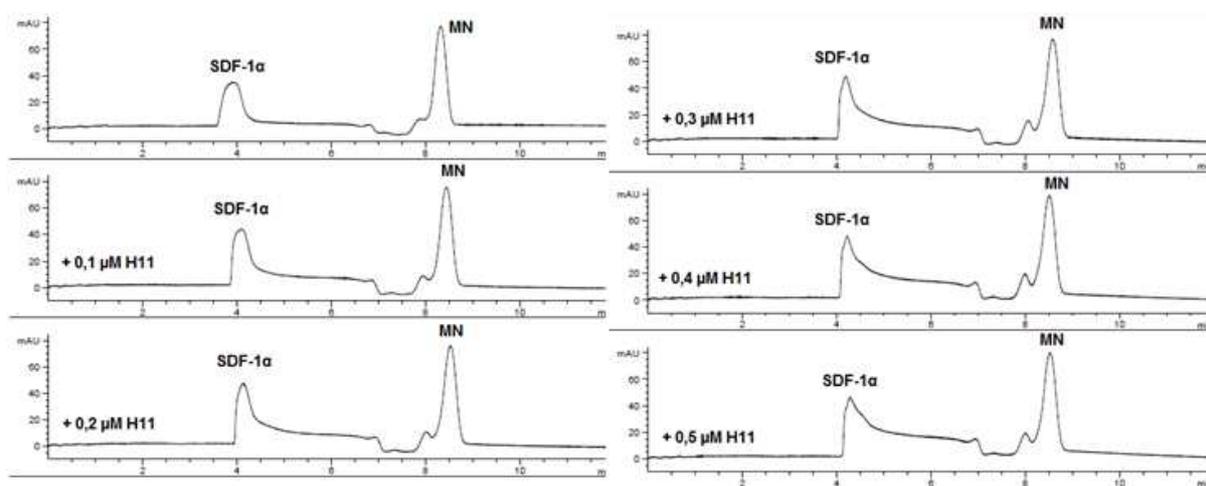
Série 1



Série 2

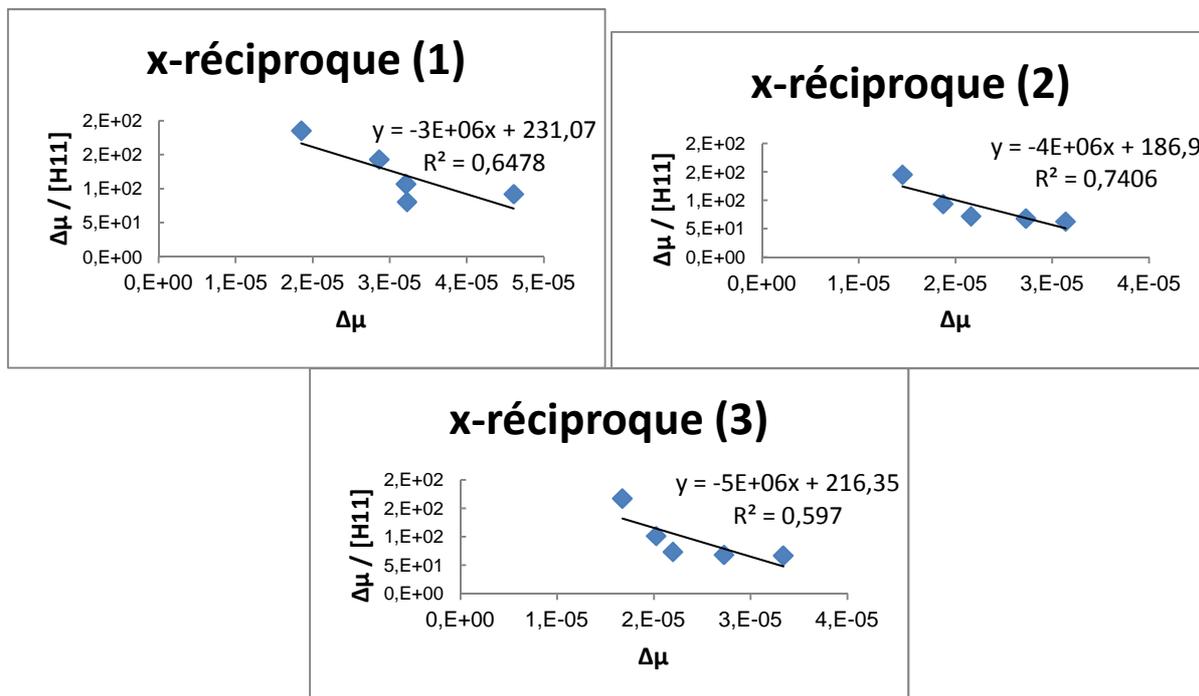


Série 3

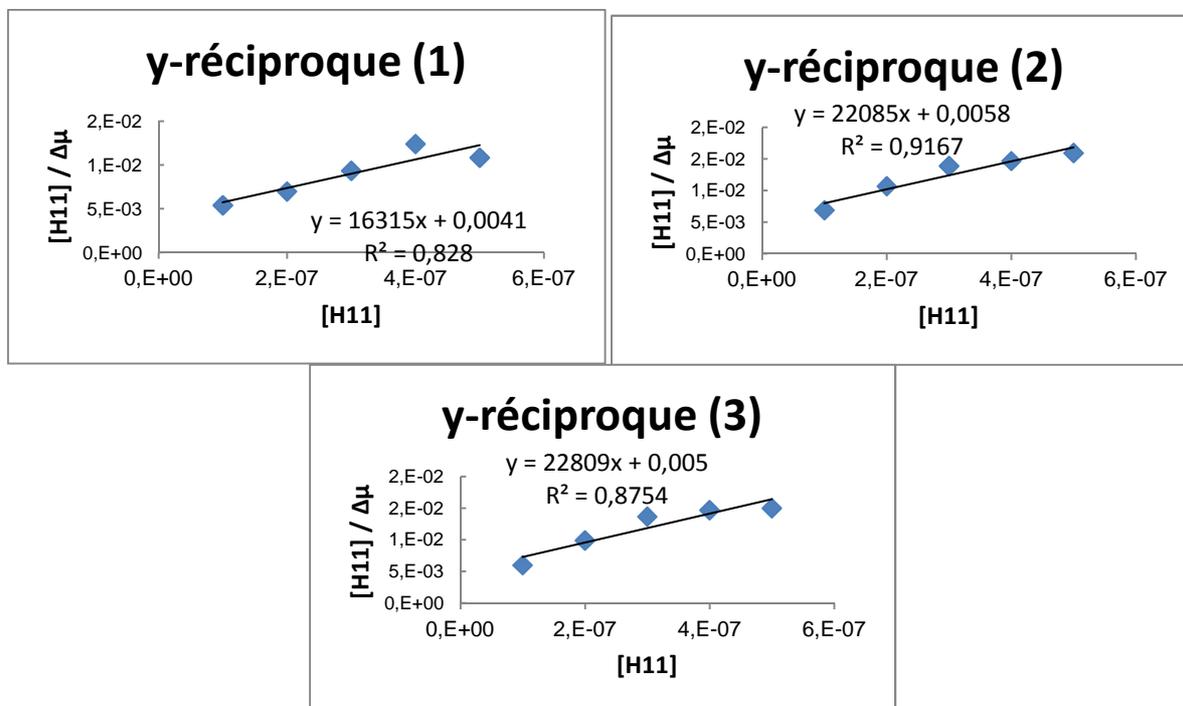


Annexe 12 : Linéarisation

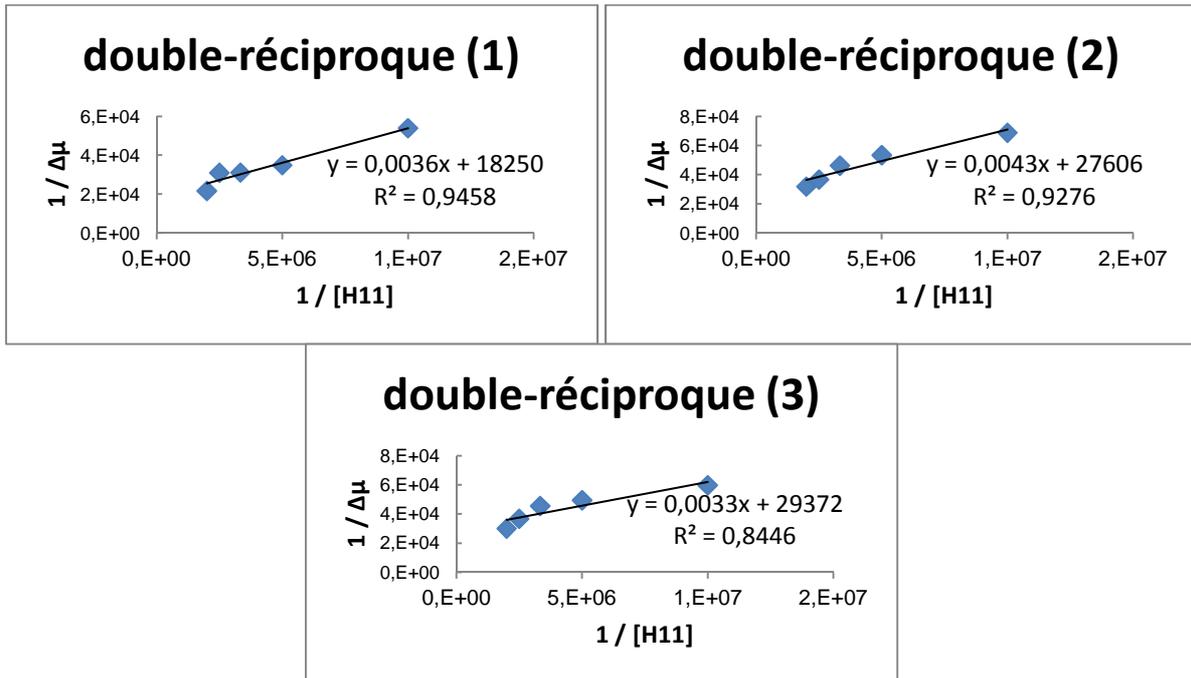
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque

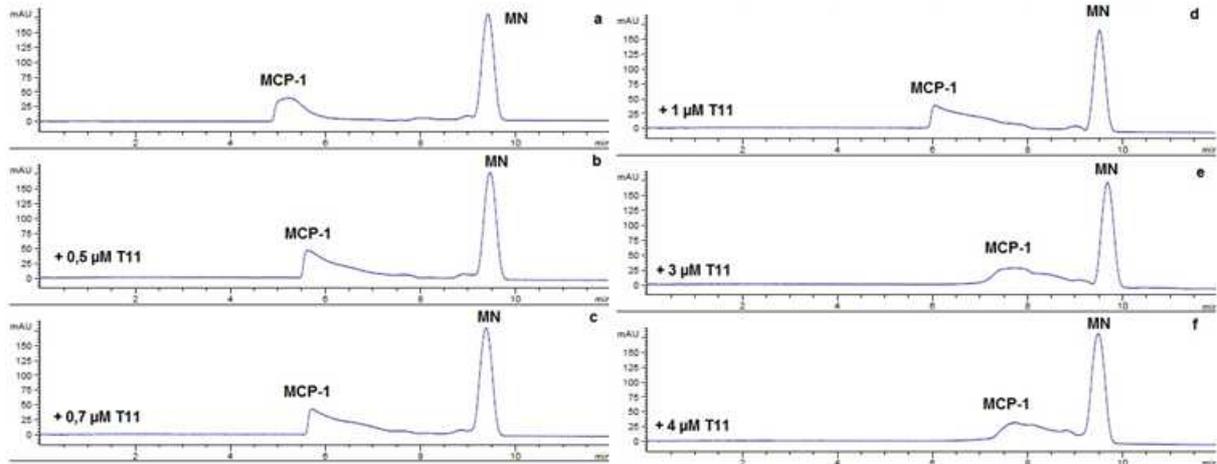


Méthode double-réiproque

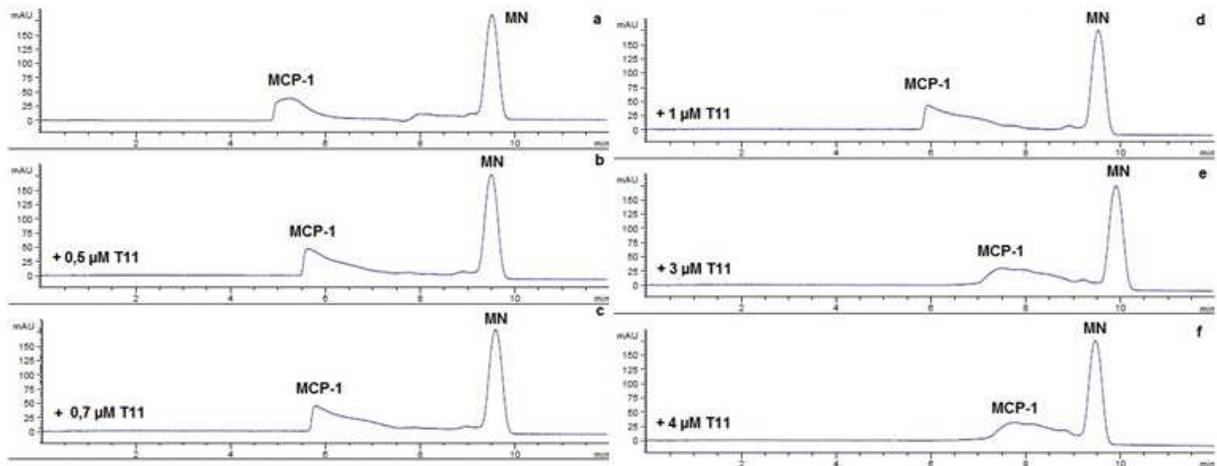


Annexe 13 : Electrophorogrammes en présence de T11

Série 2

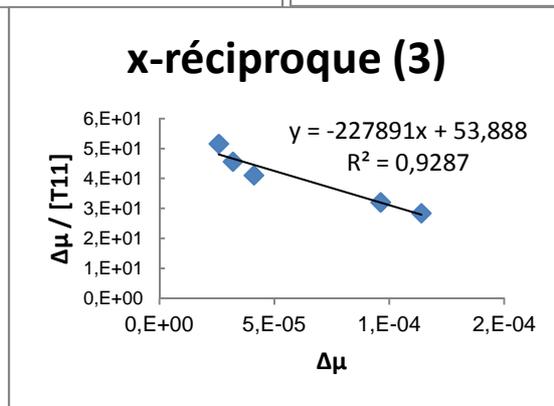
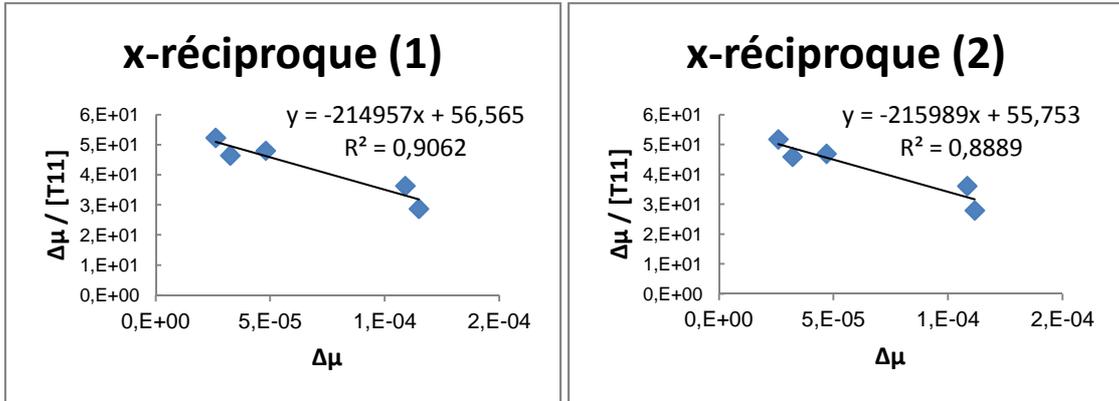


Série 3

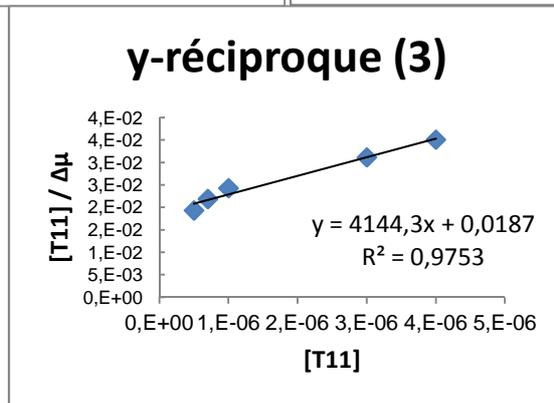
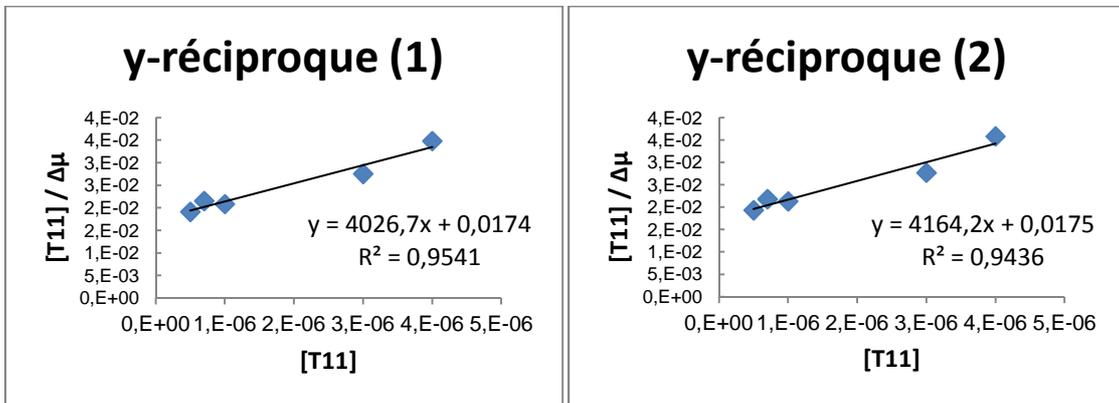


Annexe 14 : Linéarisation

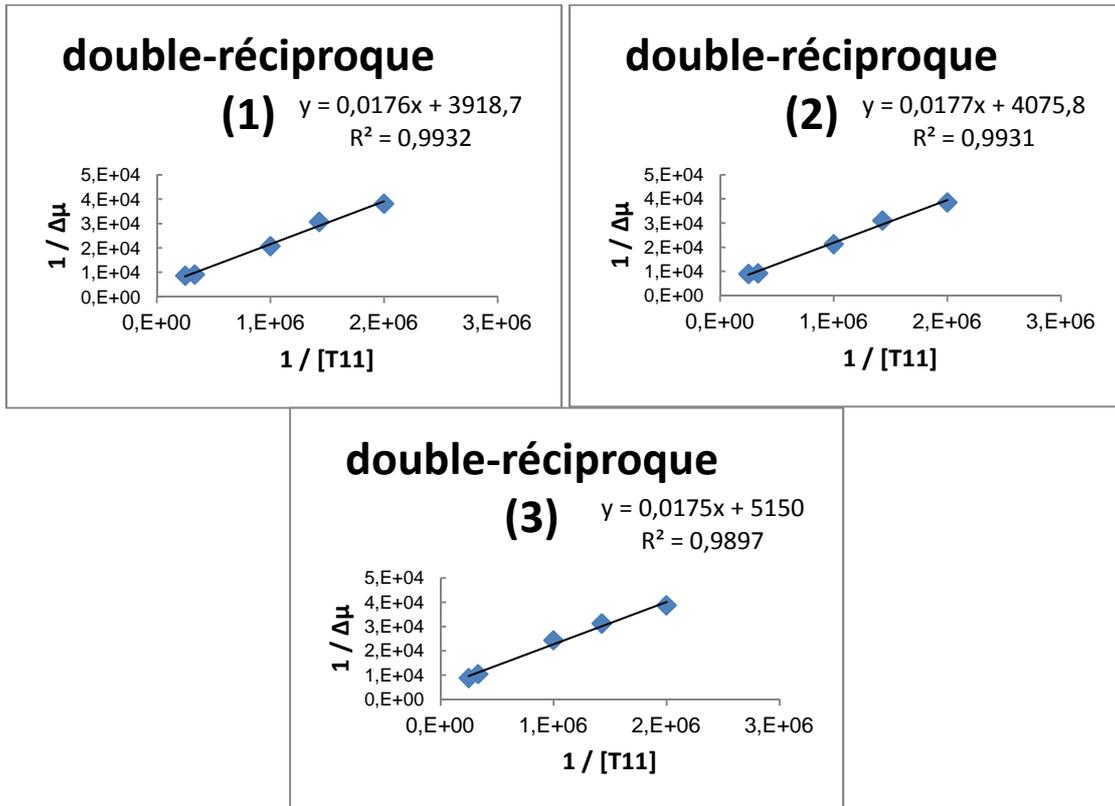
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque

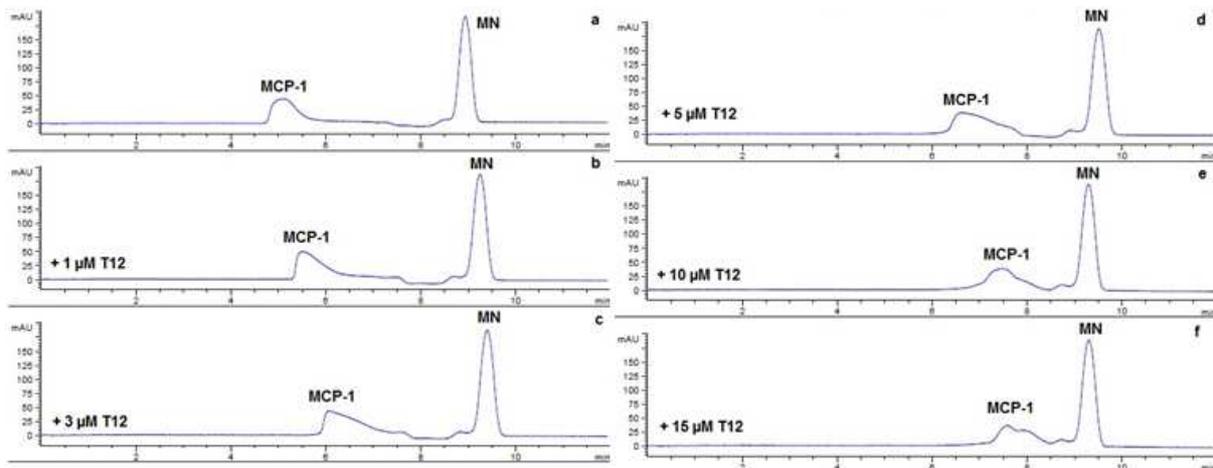


Méthode double-réciproque

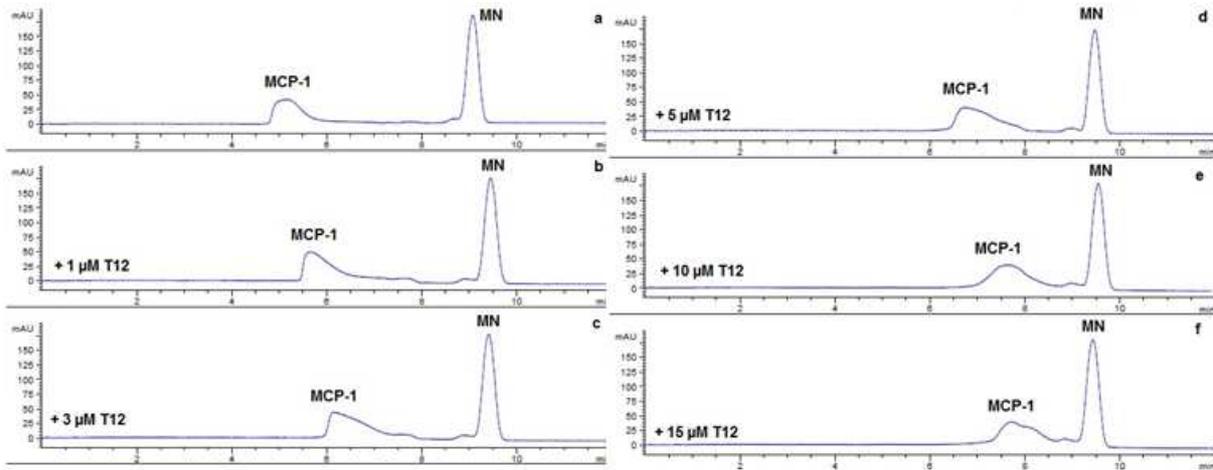


Annexe 15 : Electrophorégrammes en présence de T12

Série 2

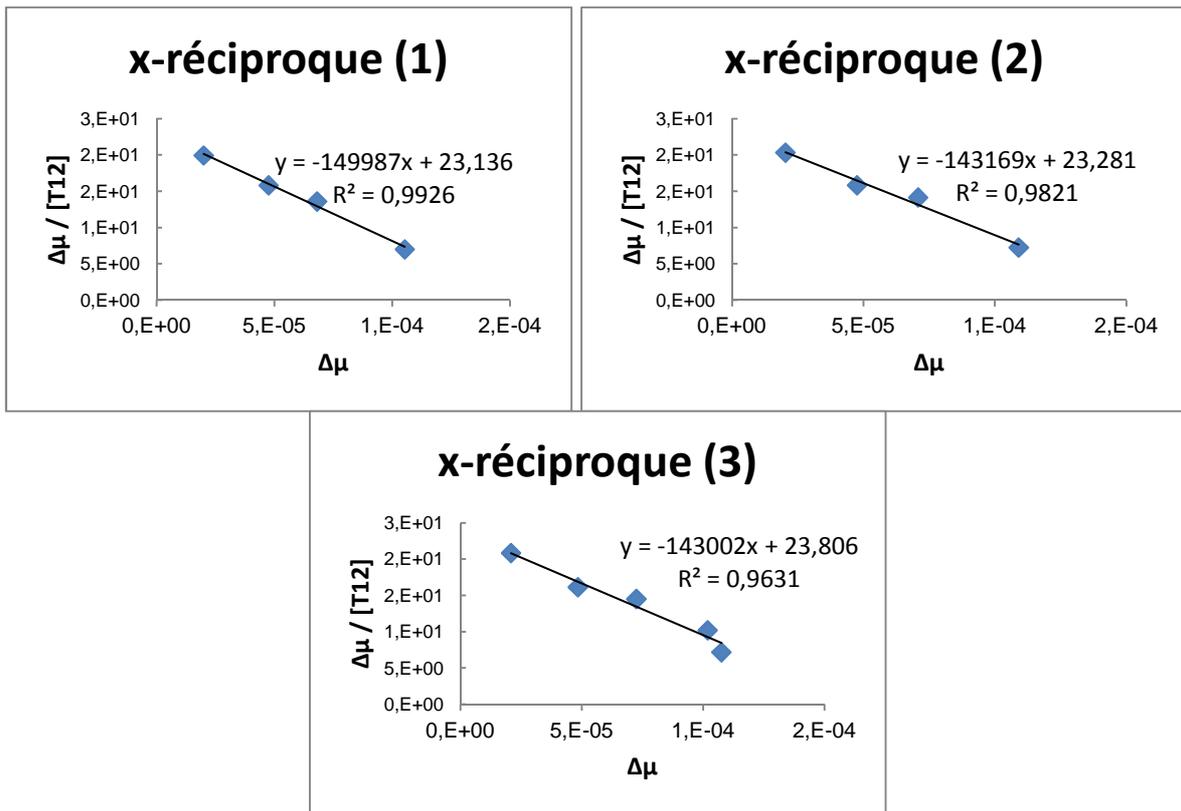


Série 3

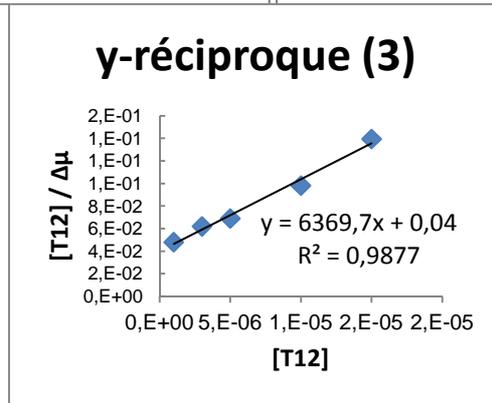
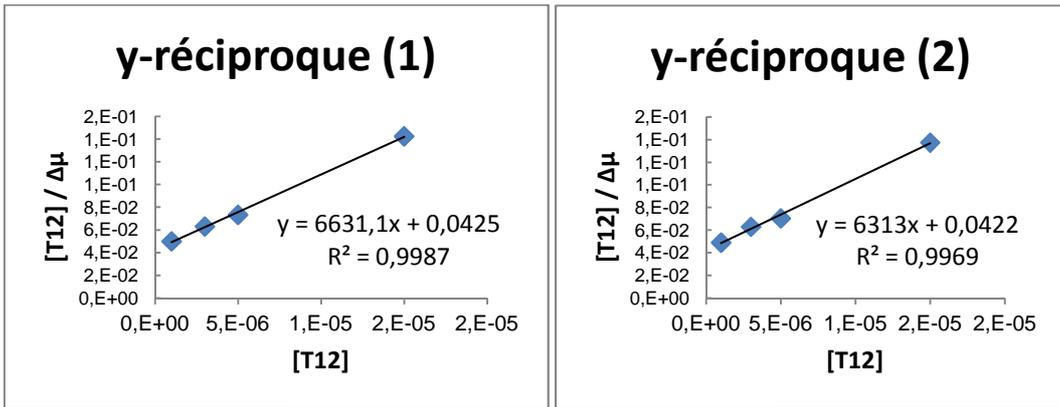


Annexe 16 : Linéarisation

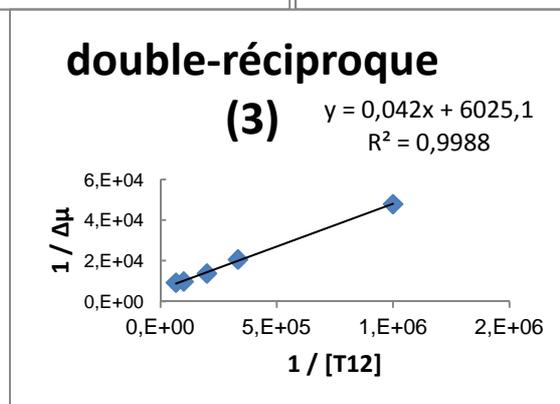
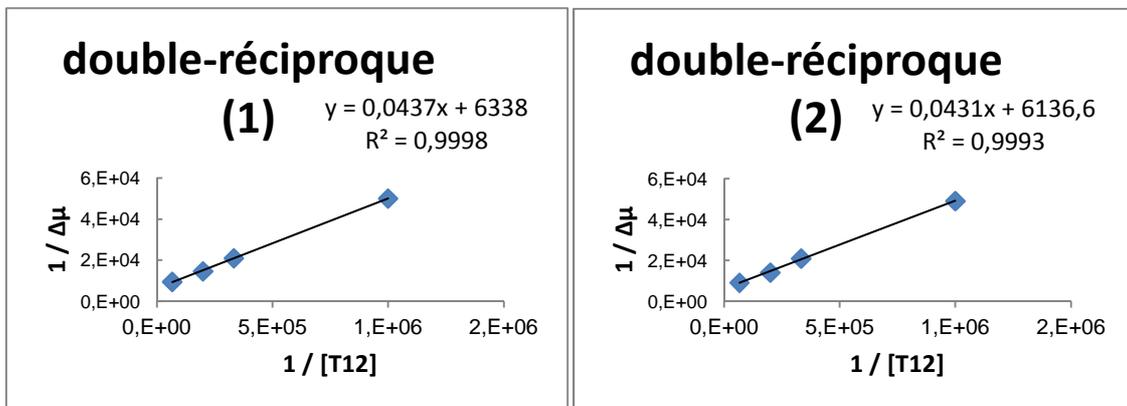
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque

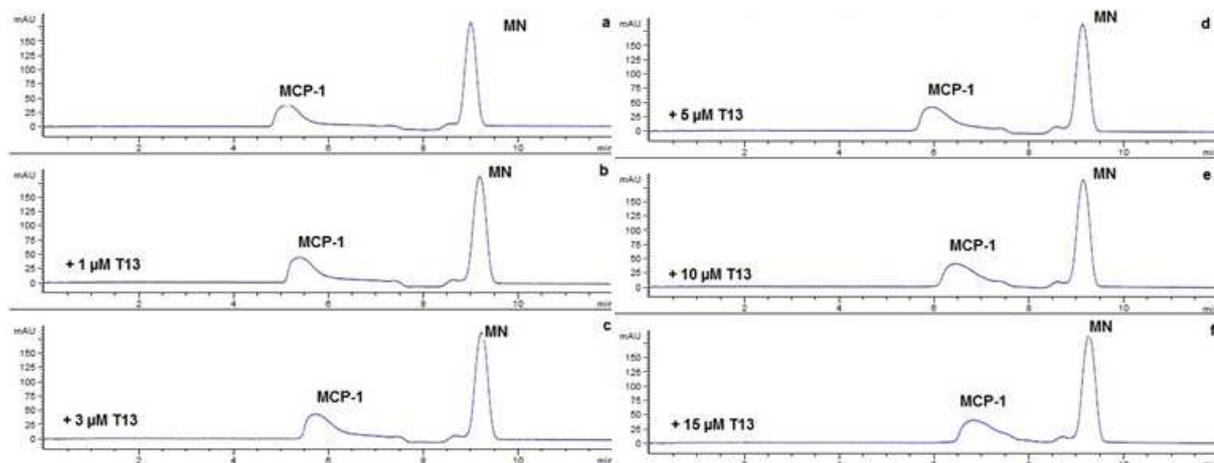


Méthode double-réciproque

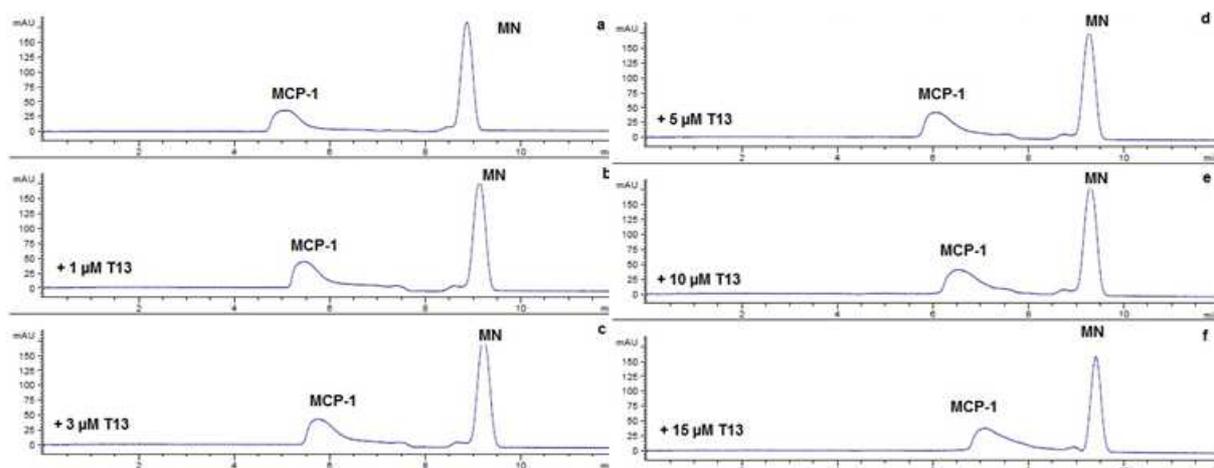


Annexe 17 : Electrophorégrammes en présence de T13

Série 2

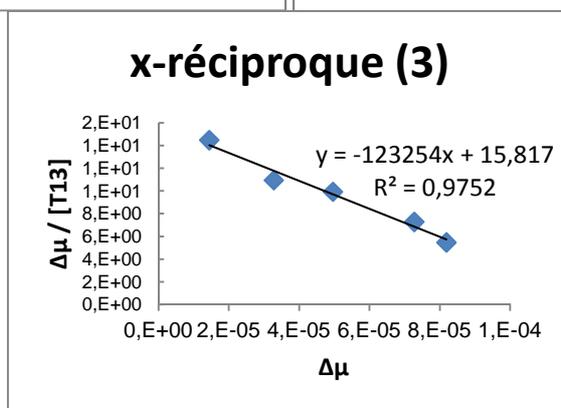
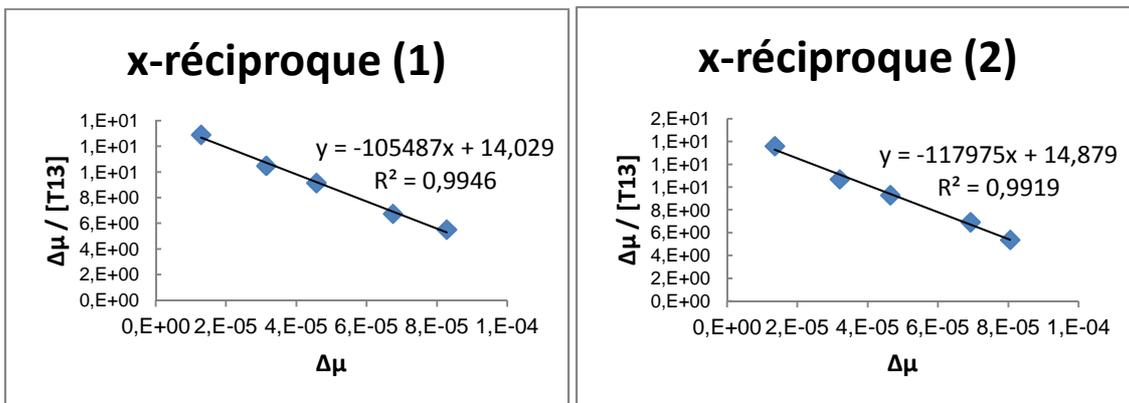


Série 3

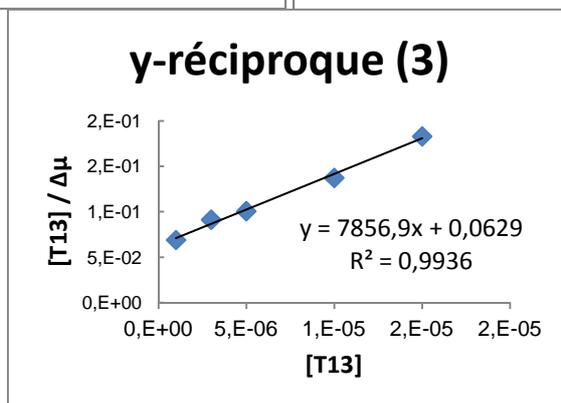
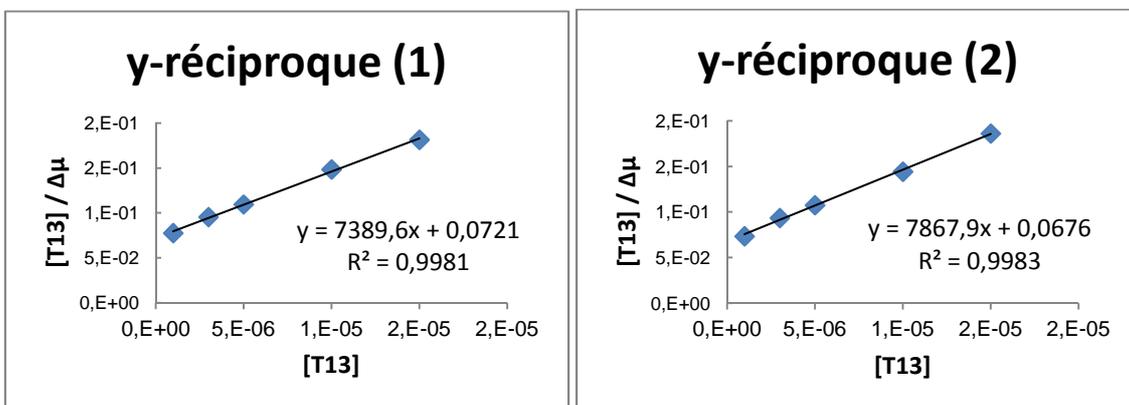


Annexe 18 : Linéarisation

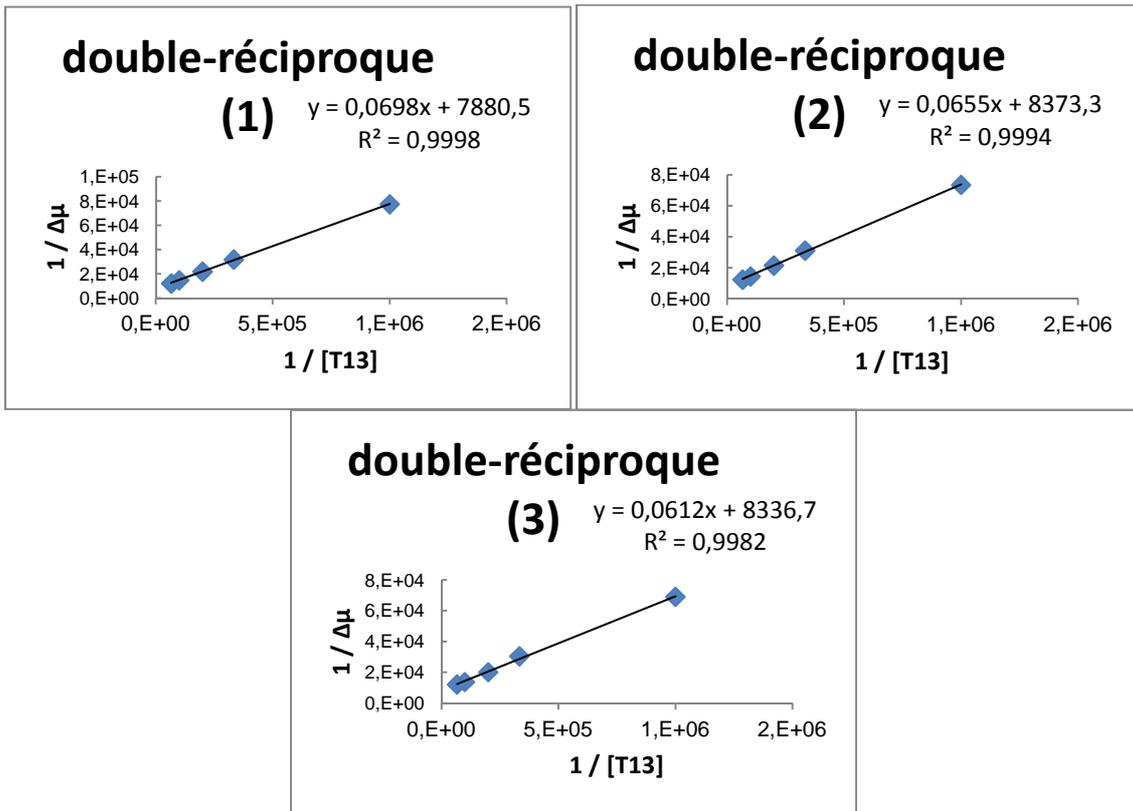
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque

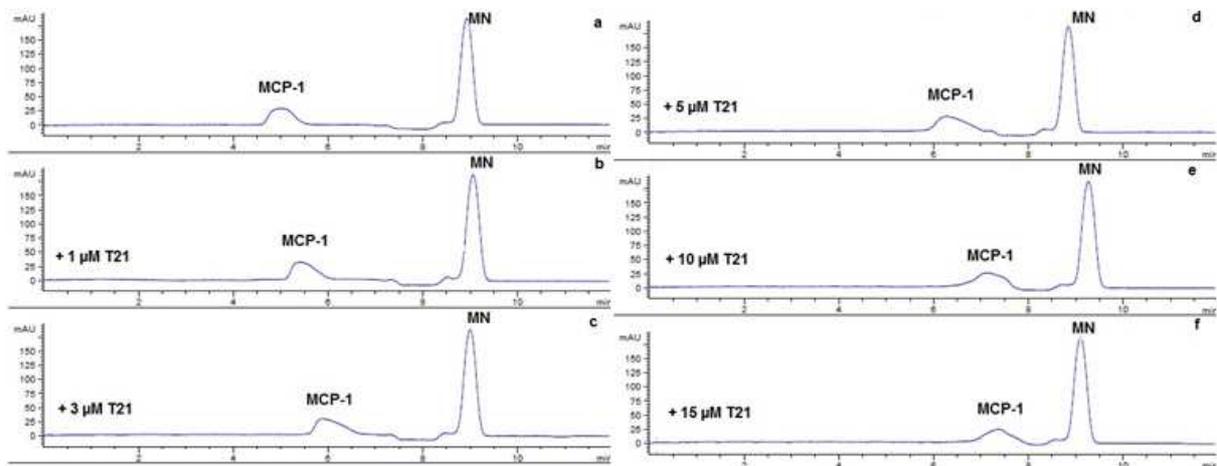


Méthode double-réciproque

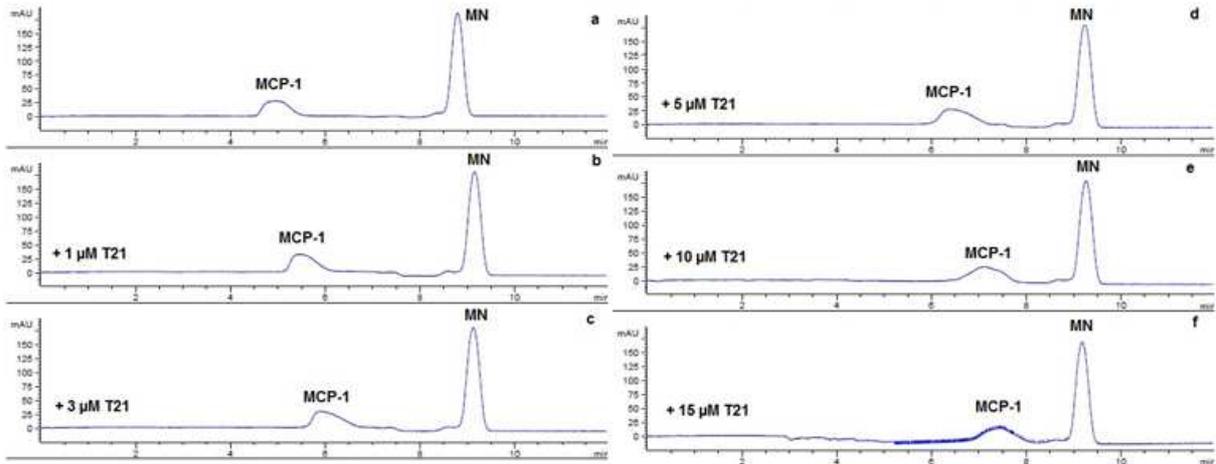


Annexe 19 : Electrophorégrammes en présence de T21

Série 2

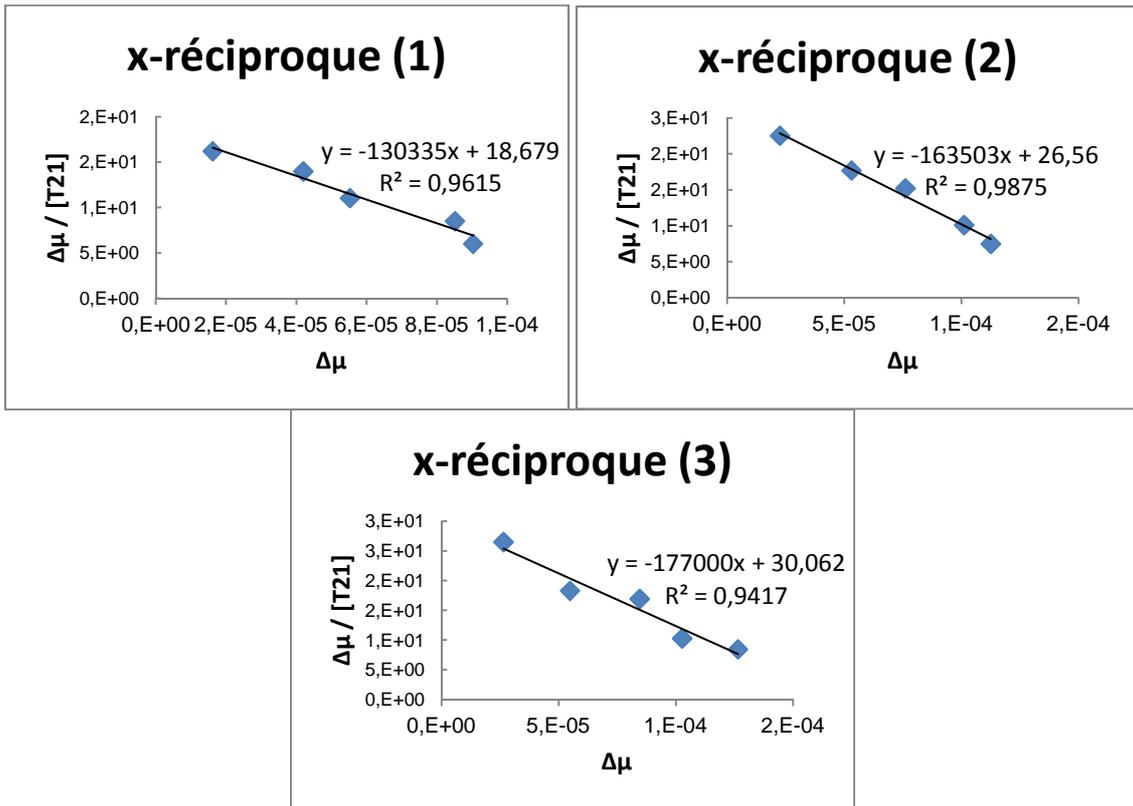


Série 3

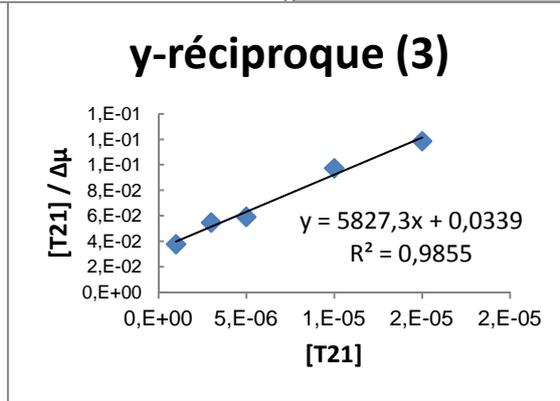
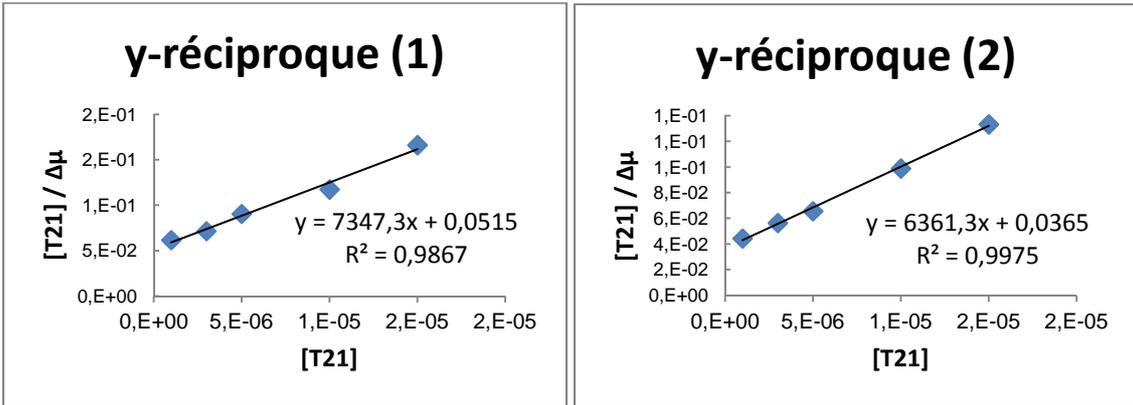


Annexe 20 : Linéarisation

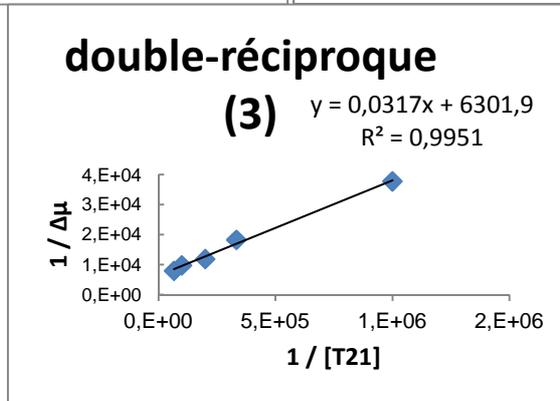
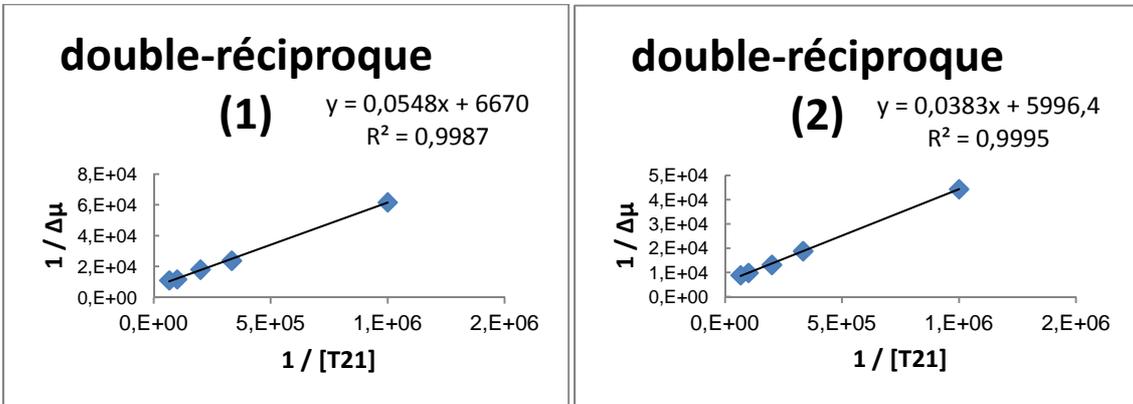
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque

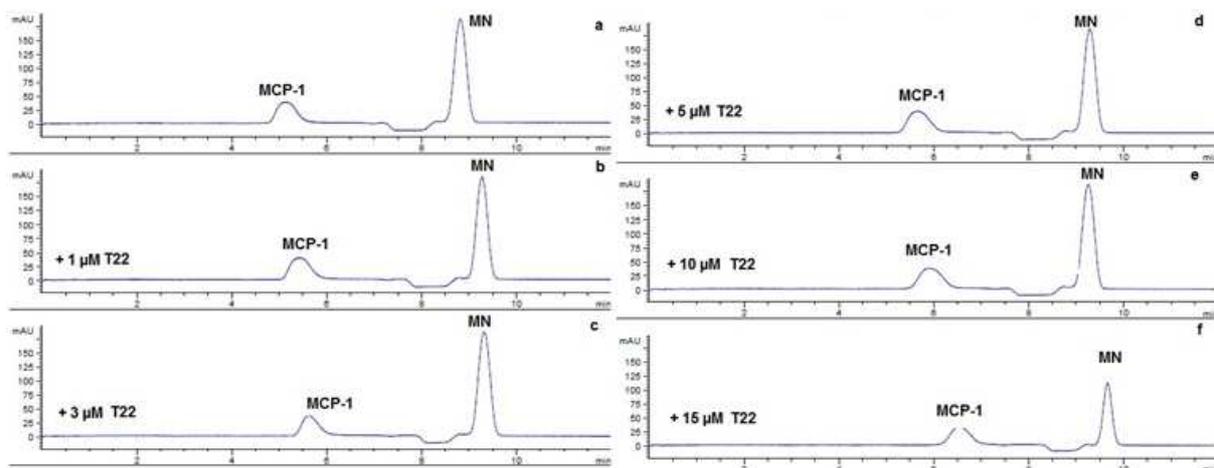


Méthode double-réciproque

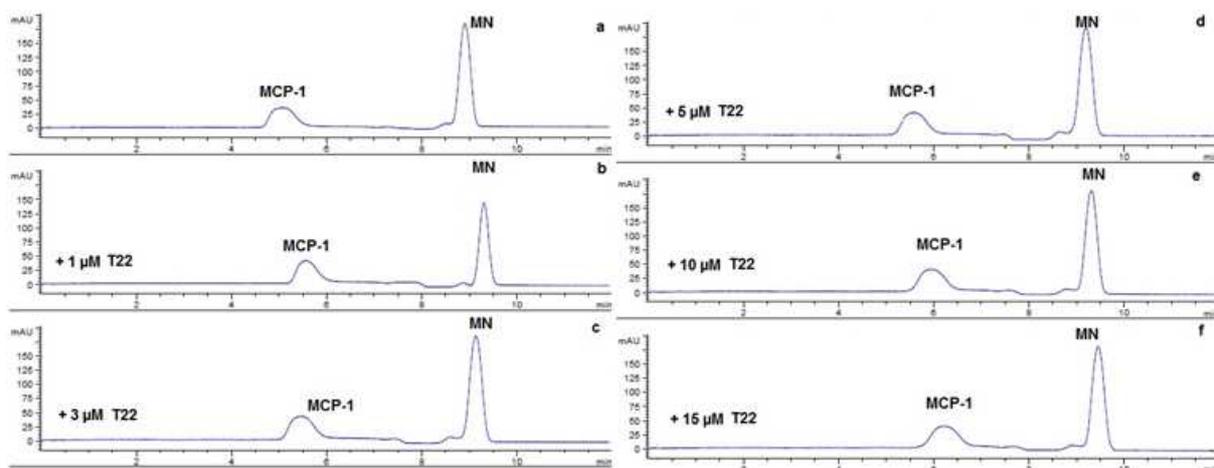


Annexe 21 : Electrophorogrammes en présence de T22

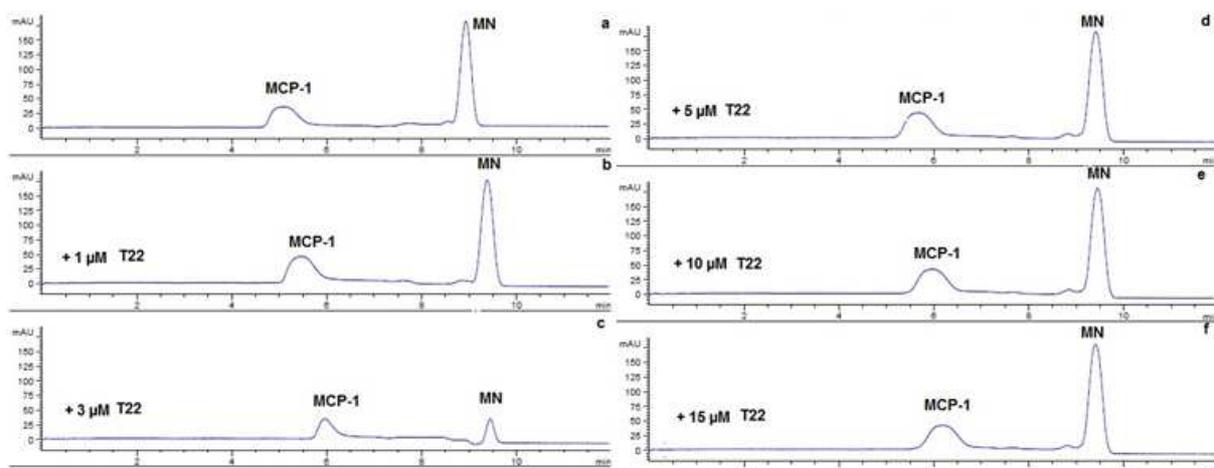
Série 1



Série 2

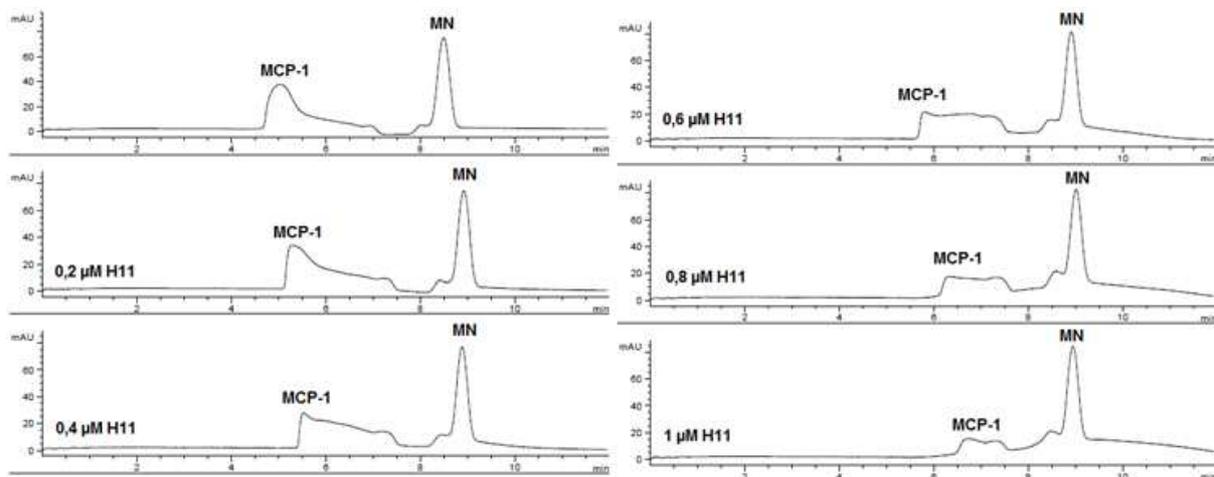


Série 3

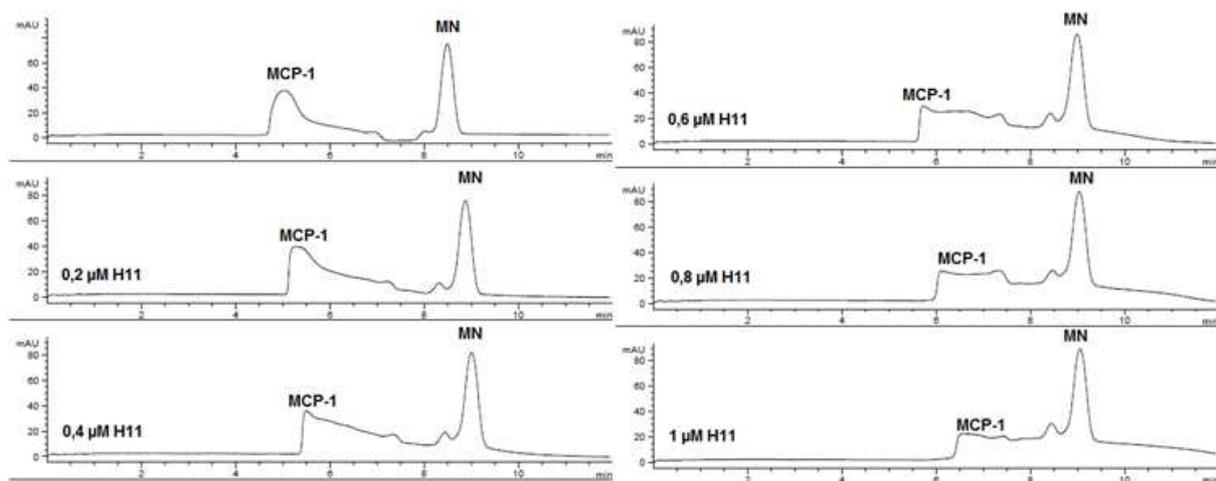


Annexe 22 : Electrophorégrammes en présence de H11

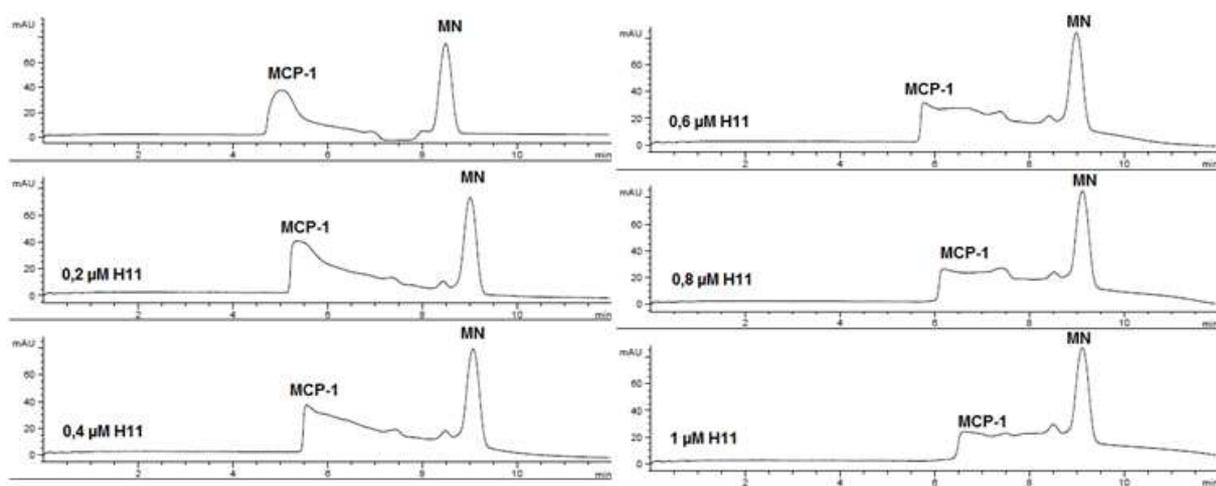
Série 1



Série 2

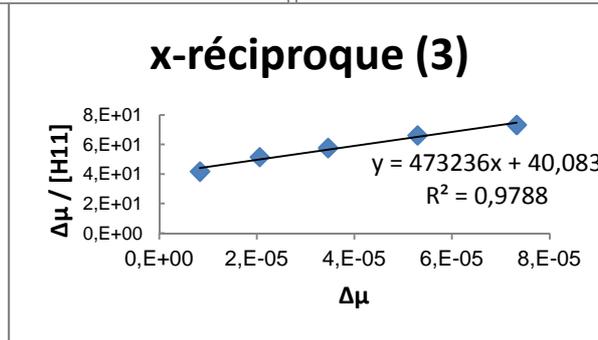
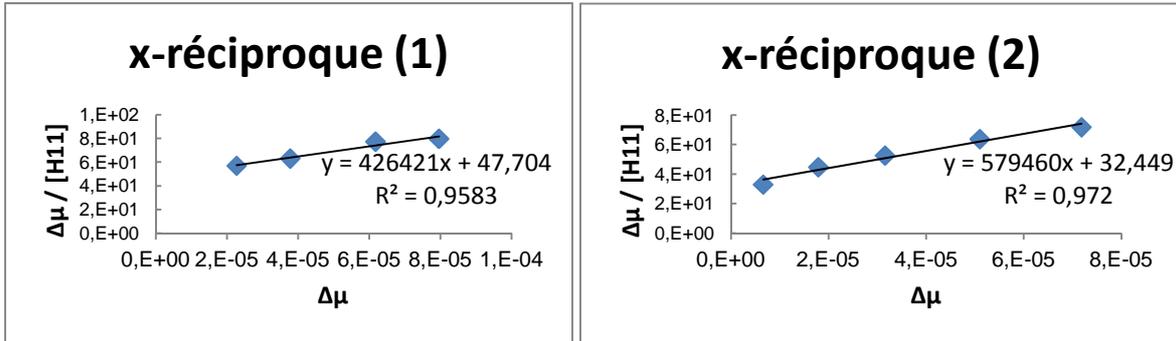


Série 3

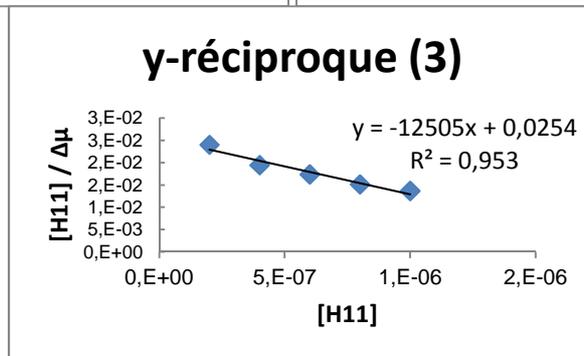
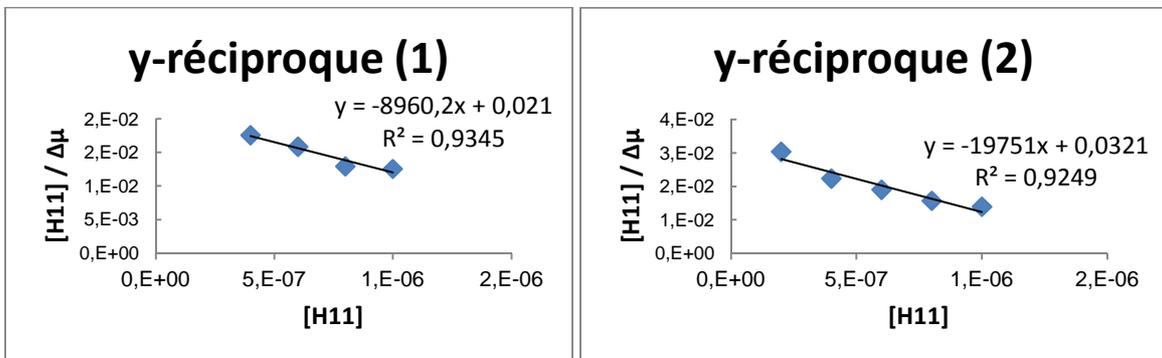


Annexe 23 : Linéarisation

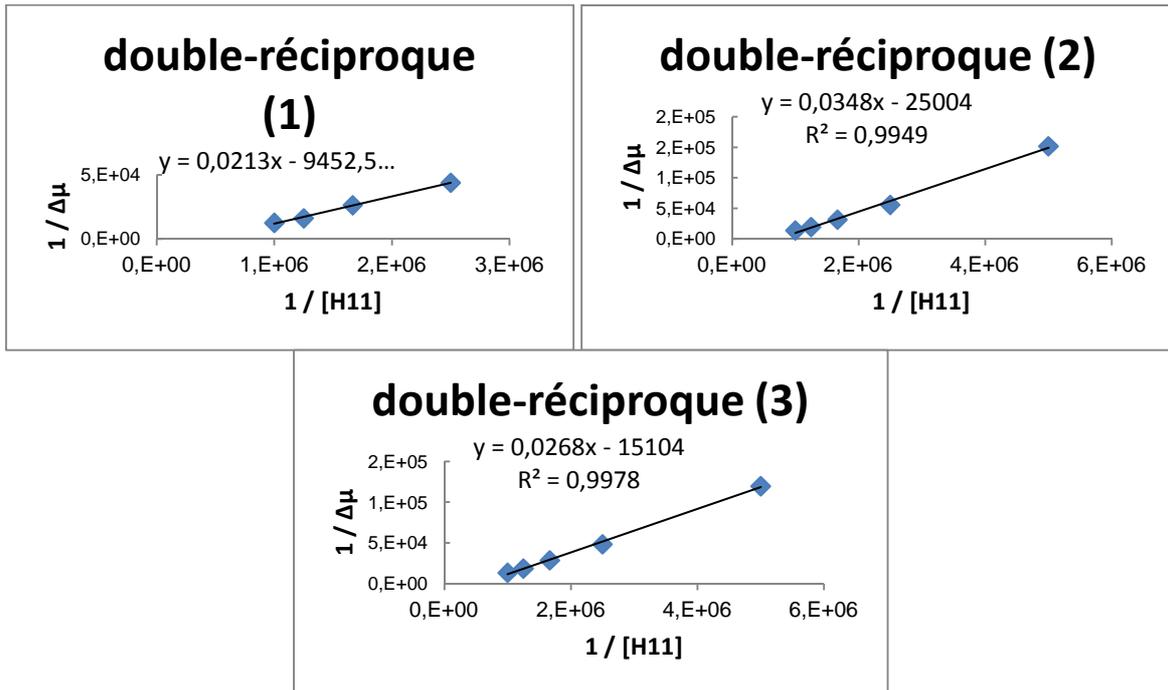
Méthode x-réciproque



Méthode y-réciproque



Méthode double-réiproque



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ceroni, A., A. Dell, and S.M. Haslam, *The GlycanBuilder: a fast, intuitive and flexible software tool for building and displaying glycan structures*. Source Code for Biology and Medicine, 2007. **2**: p. 3.
2. Bernfield, M., et al., *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 729-77.
3. Conrad, H.E., *Heparin-Binding Proteins*. San Diego, CA: Academic Press, 1998.
4. Jackson, R.L., S.J. Busch, and A.D. Cardin, *Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes*. Physiol Rev, 1991. **71**(2): p. 481-539.
5. Casu, B. and U. Lindahl, *Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate*. Adv Carbohydr Chem Biochem, 2001. **57**: p. 159-206.
6. Itano, N., *Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan*. J Biochem, 2008. **144**(2): p. 131-7.
7. Nader, H.B., et al., *Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates?* Braz J Med Biol Res, 1999. **32**(5): p. 529-38.
8. Warda, M., et al., *Turkey intestine as a commercial source of heparin? Comparative structural studies of intestinal avian and mammalian glycosaminoglycans*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2003. **134**(1): p. 189-97.
9. Ototani, N., M. Kikuchi, and Z. Yosizawa, *Comparative studies on the structures of highly active and relatively inactive forms of whale heparin*. J Biochem, 1981. **90**(1): p. 241-6.
10. Warda, M., et al., *Isolation and characterization of raw heparin from dromedary intestine: evaluation of a new source of pharmaceutical heparin*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2003. **136**(4): p. 357-65.
11. Bland, C.E., et al., *Mouse heparin proteoglycan. Synthesis by mast cell-fibroblast monolayers during lymphocyte-dependent mast cell proliferation*. J Biol Chem, 1982. **257**(15): p. 8661-6.
12. Linhardt, R.J., et al., *Isolation and characterization of human heparin*. Biochemistry, 1992. **31**(49): p. 12441-5.
13. Hovingh, P. and A. Linker, *An unusual heparan sulfate isolated from lobsters (*Homarus americanus*)*. J Biol Chem, 1982. **257**(16): p. 9840-4.
14. Dietrich, C.P., et al., *Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis**. Biochim Biophys Acta, 1999. **1428**(2-3): p. 273-83.
15. Hovingh, P. and A. Linker, *Glycosaminoglycans in *Anodonta californiensis*, a Freshwater Mussel*. Biol Bull, 1993. **185**(2): p. 263-276.
16. Pejler, G., et al., *Structure and antithrombin-binding properties of heparin isolated from the clams *Anomalocardia brasiliensis* and *Tivela mactroides**. J Biol Chem, 1987. **262**(24): p. 11413-21.
17. Medeiros, G.F., et al., *Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1475**(3): p. 287-94.
18. Lindahl, U., Kjellen L., *Heparin or heparan sulfate - what is the difference?* Thromb Haemost, 1991. **66**: p. 44-48.
19. Varki, *The Essential of Glycobiology*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
20. Lyon, M. and J.T. Gallagher, *Bio-specific sequences and domains in heparan sulphate and the regulation of cell growth and adhesion*. Matrix Biol, 1998. **17**(7): p. 485-93.
21. Lohse, D.L. and R.J. Linhardt, *Purification and characterization of heparin lyases from *Flavobacterium heparinum**. J Biol Chem, 1992. **267**(34): p. 24347-55.
22. Linhardt, R.J., et al., *Examination of the substrate specificity of heparin and heparan sulfate lyases*. Biochemistry, 1990. **29**(10): p. 2611-7.

23. Desai, U.R., H.M. Wang, and R.J. Linhardt, *Specificity studies on the heparin lyases from Flavobacterium heparinum*. *Biochemistry*, 1993. **32**(32): p. 8140-5.
24. Bishop, J.R., M. Schuksz, and J.D. Esko, *Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology*. *Nature*, 2007. **446**(7139): p. 1030-7.
25. Lindahl, U., M. Kusche-Gullberg, and L. Kjellen, *Regulated Diversity of Heparan Sulfate*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(39): p. 24979-24982.
26. Rabenstein, D.L., *Heparin and heparan sulfate: structure and function*. *Natural Product Reports*, 2002. **19**(3): p. 312-331.
27. Guimond, S.E. and J.E. Turnbull, *Heparan sulphate-growth factor interactions in development and disease*. *Trends In Glycoscience And Glycotechnology*, 2005. **17**(98): p. 241-253.
28. Toole, B.P., *Hyaluronan in morphogenesis*. *J Intern Med*, 1997. **242**(1): p. 35-40.
29. Toole, B.P., T.N. Wight, and M.I. Tammi, *Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4593-6.
30. Chen, W.Y. and G. Abatangelo, *Functions of hyaluronan in wound repair*. *Wound Repair Regen*, 1999. **7**(2): p. 79-89.
31. Laurent, T.C., U.B. Laurent, and J.R. Fraser, *The structure and function of hyaluronan: An overview*. *Immunol Cell Biol*, 1996. **74**(2): p. A1-7.
32. Tully, S.E., et al., *A chondroitin sulfate small molecule that stimulates neuronal growth*. *Journal of the American Chemical Society*, 2004. **126**(25): p. 7736-7737.
33. Trowbridge, J.M. and R.L. Gallo, *Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan*. *Glycobiology*, 2002. **12**(9): p. 117R-125R.
34. Funderburgh, J.L., *Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function*. *Glycobiology*, 2000. **10**(10): p. 951-958.
35. Lizzo R.V., S.A.J.D., *Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena*. *J Clin Invest*, 2001. **108**: p. 349-355.
36. Holt, C.E. and B.J. Dickson, *Sugar codes for axons?* *Neuron*, 2005. **46**(2): p. 169-72.
37. Liu, D., et al., *Dynamic regulation of tumor growth and metastasis by heparan sulfate glycosaminoglycans*. *Semin Thromb Hemost*, 2002. **28**(1): p. 67-78.
38. Timar, J., et al., *Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer*. *Semin Cancer Biol*, 2002. **12**(3): p. 173-86.
39. Sanderson, R.D., *Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis*. *Semin Cell Dev Biol*, 2001. **12**(2): p. 89-98.
40. Casu, B., M. Guerrini, and G. Torri, *Structural and conformational aspects of the anticoagulant and anti-thrombotic activity of heparin and dermatan sulfate*. *Curr Pharm Des*, 2004. **10**(9): p. 939-49.
41. Fareed, J., D.A. Hoppensteadt, and R.L. Bick, *An update on heparins at the beginning of the new millennium*. *Semin Thromb Hemost*, 2000. **26 Suppl 1**: p. 5-21.
42. Rosenberg, R.D. and P.S. Damus, *The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor*. *J Biol Chem*, 1973. **248**(18): p. 6490-505.
43. Andersson, L.O., et al., *Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin iii and by gel filtration*. *Thromb Res*, 1976. **9**(6): p. 575-83.
44. Hook, M., et al., *Anticoagulant activity of heparin: separation of high-activity and low-activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin*. *FEBS Lett*, 1976. **66**(1): p. 90-3.
45. Li, W., et al., *Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(9): p. 857.
46. Olson, S.T., et al., *Role Of The Antithrombin-Binding Pentasaccharide In Heparin Acceleration Of Antithrombin-Proteinase Reactions - Resolution Of The Antithrombin Conformational Change Contribution To Heparin Rate Enhancement*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(18): p. 12528-12538.
47. Sekiguchi, K., et al., *Binding of fibronectin and its proteolytic fragments to glycosaminoglycans. Exposure of cryptic glycosaminoglycan-binding domains upon limited proteolysis*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(23): p. 14359-65.

48. Talts, J.F., et al., *Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins*. *Embo J*, 1999. **18**(4): p. 863-70.
49. Forsberg, E., et al., *Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme*. *Nature*, 1999. **400**(6746): p. 773-6.
50. Humphries, D.E., et al., *Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells*. *Nature*, 1999. **400**(6746): p. 769-72.
51. Reeves, E.P., et al., *Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux*. *Nature*, 2002. **416**(6878): p. 291-7.
52. Handel, T.M., et al., *Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines*. *Annual Review of Biochemistry*, 2005. **74**: p. 385.
53. Tanaka, Y., et al., *T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta*. *Nature*, 1993. **361**(6407): p. 79-82.
54. Overall, C.M., G.A. McQuibban, and I. Clark-Lewis, *Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics*. *Biol Chem*, 2002. **383**(7-8): p. 1059-66.
55. Flannery, C.R., *MMPs and ADAMTSs: functional studies*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 544-69.
56. Saksela, O., et al., *Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation*. *J Cell Biol*, 1988. **107**(2): p. 743-51.
57. McCaffrey, T.A., et al., *Protection of transforming growth factor-beta 1 activity by heparin and fucoidan*. *J Cell Physiol*, 1994. **159**(1): p. 51-9.
58. Clarke, D., et al., *Interaction of interleukin 7 (IL-7) with glycosaminoglycans and its biological relevance*. *Cytokine*, 1995. **7**(4): p. 325-30.
59. Lortat-Jacob, H. and J.A. Grimaud, *Interferon-gamma binds to heparan sulfate by a cluster of amino acids located in the C-terminal part of the molecule*. *FEBS Letters*, 1991. **280**(1): p. 152.
60. Lortat-Jacob, H., et al., *Non-receptor-mediated tissue localization of human interferon-gamma: role of heparan sulfate/heparin-like molecules*. *Cytokine*, 1996. **8**(7): p. 557-66.
61. Barbouche, R., et al., *Glycosaminoglycans and protein disulfide isomerase-mediated reduction of HIV Env*. *Molecular Pharmacology*, 2005. **67**(4): p. 1111-1118.
62. Barragan, A., et al., *Role of glycans in Plasmodium falciparum infection*. *Biochem Soc Trans*, 1999. **27**(4): p. 487-93.
63. Saphire, A.C., et al., *Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages*. *J Virol*, 2001. **75**(19): p. 9187-200.
64. Bobardt, M.D., et al., *Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes*. *Immunity*, 2003. **18**(1): p. 27-39.
65. Gieselmann, V., *Lysosomal Storage Diseases*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis Of Disease*, 1995. **1270**(2-3): p. 103-136.
66. Venkatesan, N., et al., *Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-1 gene delivery: A strategy to promote cartilage repair*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 2004. **101**(52): p. 18087-18092.
67. Venkatesan, N., et al., *Stimulation of proteoglycon synthesis towards cartilage repair*. *Medecine Sciences*, 2005. **21**(5): p. 471-473.
68. Snow, A.D., et al., *The Presence Of Heparan-Sulfate Proteoglycans In The Neuritic Plaques And Congophilic Angiopathy In Alzheimers-Disease*. *American Journal Of Pathology*, 1988. **133**(3): p. 456-463.
69. Goedert, M. and M.G. Spillantini, *A Century of Alzheimer's Disease*. *Science*, 2006. **314**(5800): p. 777-781.
70. Van Horssen, J., et al., *Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders*. *Lancet Neurology*, 2003. **2**(8): p. 482-492.

71. Fry, E.E., et al., *The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex*. Embo J, 1999. **18**(3): p. 543-54.
72. Rostand, K.S. and J.D. Esko, *Microbial adherence to and invasion through proteoglycans*. Infect Immun, 1997. **65**(1): p. 1-8.
73. Spear, P.G., R.J. Eisenberg, and G.H. Cohen, *Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry*. Virology, 2000. **275**(1): p. 1-8.
74. Spear, P.G., *Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry*. Cell Microbiol, 2004. **6**(5): p. 401-10.
75. Shukla, D. and P.G. Spear, *Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry*. J Clin Invest, 2001. **108**(4): p. 503-10.
76. Rider, C.C., *The potential for heparin and its derivatives in the therapy and prevention of HIV-1 infection*. Glycoconj J, 1997. **14**(5): p. 639-42.
77. Rider, C.C., et al., *Anti-HIV-1 activity of chemically modified heparins: correlation between binding to the V3 loop of gp120 and inhibition of cellular HIV-1 infection in vitro*. Biochemistry, 1994. **33**(22): p. 6974-80.
78. Lindahl, U., *Heparan sulfate-protein interactions--a concept for drug design?* Thromb Haemost, 2007. **98**(1): p. 109-15.
79. Fugedi, P., *The potential of the molecular diversity of heparin and heparan sulfate for drug development*. Mini Rev Med Chem, 2003. **3**(7): p. 659-67.
80. Johnson, Z., A.E. Proudfoot, and T.M. Handel, *Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2005. **16**(6): p. 625.
81. Spillmann, D. and U. Lindahl, *Glycosaminoglycan-protein interactions: a question of specificity*. Current Opinion in Structural Biology, 1994. **4**(5): p. 677.
82. Weitz, J.I., *New Anticoagulants for Treatment of Venous Thromboembolism*. Circulation, 2004. **110**(9_suppl_1): p. I-19-26.
83. Coombe, D.R., *Biological implications of glycosaminoglycan interactions with haemopoietic cytokines*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(7): p. 598-607.
84. Webb, L.M., et al., *Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7158-62.
85. Mulloy, B., et al., *The interaction between heparin and polylysine: a circular dichroism and molecular modelling study*. Braz J Med Biol Res, 1996. **29**(6): p. 721-9.
86. Lehninger A.L., N.D.L., Cox M.M., *Principles of Biochemistry 4e*. New York: W.H. Freeman & Company, 2004: p. 238-271.
87. Linhardt, R.J. and N.S. Gunay, *Production and chemical processing of low molecular weight heparins*. Semin Thromb Hemost, 1999. **25 Suppl 3**: p. 5-16.
88. Wardrop, D. and D. Keeling, *The story of the discovery of heparin and warfarin*. Br J Haematol, 2008. **141**(6): p. 757-63.
89. Marcum, J.A., *The origin of the dispute over the discovery of heparin*. J Hist Med Allied Sci, 2000. **55**(1): p. 37-66.
90. Choay, J., et al., *Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1983. **116**(2): p. 492.
91. Johnson, D.J., et al., *Antithrombin-S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation*. Embo J, 2006. **25**(9): p. 2029-37.
92. Tan, K., et al., *The structures of the thrombospondin-1 N-terminal domain and its complex with a synthetic pentameric heparin*. Structure, 2006. **14**(1): p. 33-42.
93. Herbert, J.M., et al., *Biochemical and pharmacological properties of SANORG 34006, a potent and long-acting synthetic pentasaccharide*. Blood, 1998. **91**(11): p. 4197-205.
94. Petitou, M. and C.A.A. Van Boeckel, *A Synthetic Antithrombin III Binding Pentasaccharide Is Now a Drug! What Comes Next?* Angewandte Chemie International Edition, 2004. **43**(24): p. 3118-3133.

95. Jeroen, D.C.C., et al., *The Synthesis of Well-Defined Heparin and Heparan Sulfate Fragments*. ChemInform, 2005. **36**(50).
96. Griffith, G.C., et al., *Heparin Osteoporosis*. *Jama*, 1965. **193**: p. 91-4.
97. Jaffe, M.D. and P.W. Willis, 3rd, *Multiple Fractures Associated With Long-Term Sodium Heparin Therapy*. *Jama*, 1965. **193**: p. 158-60.
98. Miller, W.E. and V.G. DeWolfe, *Osteoporosis resulting from heparin therapy. Report of a case*. *Cleve Clin Q*, 1966. **33**(1): p. 31-4.
99. Rupp, W.M., et al., *Risk of osteoporosis in patients treated with long-term intravenous heparin therapy*. *Curr Surg*, 1982. **39**(6): p. 419-22.
100. Kuschert, G.S.V., et al., *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. *Biochemistry*, 1999. **38**(39): p. 12959-12968.
101. Kokenyesi, R. and M. Bernfield, *Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(16): p. 12304-9.
102. Pikas, D.S., et al., *Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(30): p. 18770-7.
103. Wall, D., et al., *Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaccharides*. *Thromb Res*, 2001. **103**(4): p. 325-35.
104. Sasisekharan, R., R. Raman, and V. Prabhakar, *Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006. **8**: p. 181-231.
105. Fromm, J.R., et al., *Pattern and spacing of basic amino acids in heparin binding sites*. *Arch Biochem Biophys*, 1997. **343**(1): p. 92-100.
106. Caldwell, E.E., et al., *Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1996. **28**(2): p. 203-16.
107. Bae, J., et al., *Interaction of heparin with synthetic antithrombin III peptide analogues*. *Biochem J*, 1994. **301** (Pt 1): p. 121-9.
108. Malik, A. and S. Ahmad, *Sequence and structural features of carbohydrate binding in proteins and assessment of predictability using a neural network*. *BMC Struct Biol*, 2007. **7**: p. 1.
109. Shionyu-Mitsuyama, C., et al., *An empirical approach for structure-based prediction of carbohydrate-binding sites on proteins*. *Protein Eng*, 2003. **16**(7): p. 467-78.
110. Taroni, C., S. Jones, and J.M. Thornton, *Analysis and prediction of carbohydrate binding sites*. *Protein Eng*, 2000. **13**(2): p. 89-98.
111. Jairajpuri, M.A., et al., *Antithrombin III phenylalanines 122 and 121 contribute to its high affinity for heparin and its conformational activation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(18): p. 15941-50.
112. Arocas, V., et al., *The Role of Arg46 and Arg47 of Antithrombin in Heparin Binding*. *Biochemistry*, 1999. **38**(31): p. 10196-10204.
113. Desai, U., et al., *Role of arginine 129 in heparin binding and activation of antithrombin*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(25): p. 18976-84.
114. Schedin-Weiss, S., et al., *Importance of lysine 125 for heparin binding and activation of antithrombin*. *Biochemistry*, 2002. **41**(15): p. 4779-88.
115. Arocas, V., et al., *Lysine 114 of antithrombin is of crucial importance for the affinity and kinetics of heparin pentasaccharide binding*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(47): p. 43809-17.
116. Jin, L., et al., *The anticoagulant activation of antithrombin by heparin*. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 1997. **94**(26): p. 14683-14688.
117. Wettreich, A., et al., *Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(44): p. 31468-75.
118. Guo, N.H., et al., *Heparin- and sulfatide-binding peptides from the type I repeats of human thrombospondin promote melanoma cell adhesion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(7): p. 3040-4.

119. Woods, A., et al., *A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation*. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(6): p. 605-13.
120. Cardin, A.D. and H.J. Weintraub, *Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1989. **9**(1): p. 21-32.
121. Margalit, H., N. Fischer, and S.A. Ben-Sasson, *Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(26): p. 19228-31.
122. Silvian, L., et al., *Artemin crystal structure reveals insights into heparan sulfate binding*. *Biochemistry*, 2006. **45**(22): p. 6801-12.
123. Sobel, M., et al., *Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(13): p. 8857-8862.
124. Hileman, R.E., et al., *Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins*. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 1998. **20**(2): p. 156.
125. Johnson, Z., et al., *Chemokine inhibition--why, when, where, which and how?* *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 2): p. 366-77.
126. Fraser, P.E., et al., *pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides*. *Biophys J*, 1991. **60**(5): p. 1190-201.
127. Arteel, G.E., et al., *Binding of selenoprotein P to heparin: characterization with surface plasmon resonance*. *Biol Chem*, 2000. **381**(3): p. 265-8.
128. Veldkamp, C.T., et al., *The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin*. *Protein Science*, 2005. **14**(4): p. 1071-1081.
129. Hallgren, J., et al., *Histidines are critical for heparin-dependent activation of mast cell tryptase*. *J Immunol*, 2004. **173**(3): p. 1868-75.
130. Borza, D.B. and W.T. Morgan, *Histidine-proline-rich glycoprotein as a plasma pH sensor. Modulation of its interaction with glycosaminoglycans by pH and metals*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(10): p. 5493-9.
131. Haas, H.S. and K. Schauenstein, *Neuroimmunomodulation via limbic structures--the neuroanatomy of psychoimmunology*. *Progress in Neurobiology*, 1997. **51**(2): p. 195.
132. Paul, H.B., *The Psychoimmunology of Cancer: Mind and Body in the Fight for Survival*. Edited by C.E. Lewis, C. O'Sullivan and J. Barrachlough. *Oxford University Press*, 1994. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1995. **9**(3): p. 247.
133. Plata-Salamán, C.R., *Immunoregulators in the nervous system*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1991. **15**(2): p. 185.
134. Moldawer, L.L. and E.M.C. Iii, *Proinflammatory cytokines, nutritional support, and the cachexia syndrome*. *Cancer*, 1997. **79**(9): p. 1828.
135. Zumkeller, W. and P.N. Schofield, *Growth factors, cytokines and soluble forms of receptor molecules in cancer patients*. *Anticancer Research*, 1995. **15**(2): p. 343.
136. Alfano, M. and G. Poli, *Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection*. *Molecular Immunology*, 2005. **42**(2): p. 161.
137. Oppenheim, J. and H. Fujiwara, *The role of cytokines in cancer*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1996. **7**(3): p. 279.
138. Negus, R.P. and F.R. Balkwill, *Cytokines in tumour growth, migration and metastasis*. *World Journal of Urology*, 1996. **14**(3): p. 157.
139. Greenberg, D.B., et al., *Treatment-related fatigue and serum interleukin-1 levels in patients during external beam irradiation for prostate cancer*. *Journal of Pain and Symptom Management*, 1993. **8**(4): p. 196.
140. Berek, J.S., et al., *Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1991. **164**(4): p. 1038-1042; discussion 1042-1043.
141. Blay, J.Y., et al., *Serum level of interleukin 6 as a prognosis factor in metastatic renal cell carcinoma*. *Cancer Research*, 1992. **52**(12): p. 3317.

142. Seymour, J.F., et al., *Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma*. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 1995. **13**(3): p. 575.
143. Vanderschueren, B., et al., *Circulating concentrations of interleukin-6 in cancer patients and their pathogenic role in tumor-induced hypercalcemia*. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 1994. **39**(5): p. 286.
144. Van Meir, E., et al., *Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro*. *Cancer Research*, 1990. **50**(20): p. 6683.
145. Watson, J.M., et al., *Constitutive production of interleukin 6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures*. *Cancer Research*, 1990. **50**(21): p. 6959.
146. Yamashita, J., et al., *Medroxyprogesterone acetate treatment reduces serum interleukin-6 levels in patients with metastatic breast carcinoma*. *Cancer*, 1996. **78**(11): p. 2346.
147. Yanagawa, H., et al., *Serum levels of interleukin 6 in patients with lung cancer*. *British Journal of Cancer*, 1995. **71**(5): p. 1095.
148. Naylor, M.S., et al., *Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1993. **91**(5): p. 2194.
149. Balkwill, F., et al., *Evidence for tumour necrosis factor/cachectin production in cancer*. *Lancet*, 1987. **2**(8570): p. 1229.
150. Maltoni, M., et al., *Serum levels of tumour necrosis factor alpha and other cytokines do not correlate with weight loss and anorexia in cancer patients*. *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 1997. **5**(2): p. 130.
151. Nakashima, J., et al., *Tumor necrosis factor and coagulopathy in patients with prostate cancer*. *Cancer Research*, 1995. **55**(21): p. 4881.
152. Nguyen, M., et al., *Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1993. **85**(3): p. 241.
153. Nguyen, M., et al., *Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1994. **86**(5): p. 356.
154. O'Brien, T.S., et al., *Urinary basic fibroblast growth factor in patients with bladder cancer and benign prostatic hypertrophy*. *British Journal of Urology*, 1995. **76**(3): p. 311.
155. Nishimura, R., et al., *High level of beta-type transforming growth factor activity in human urine obtained from cancer patients*. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 1986. **77**(6): p. 560.
156. Tachibana, M., et al., *Autocrine growth of transitional cell carcinoma of the bladder induced by granulocyte-colony stimulating factor*. *Cancer Research*, 1995. **55**(15): p. 3438.
157. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997. **15**: p. 675.
158. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity*. *Immunity*, 2000. **12**(2): p. 121.
159. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000. **18**: p. 217.
160. Mellado, M., et al., *Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation*. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001. **19**: p. 397.
161. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines*. *Nat. Immunol.*, 2001. **2**: p. 123.
162. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. *Nat. Immunol.*, 2001. **2**: p. 129.
163. Luther, S.A. and J.G. Cyster, *Chemokines as regulators of T cell differentiation*. *Nat. Immunol.*, 2001. **2**: p. 102.

164. Mackay, C.R., *Chemokines: immunology's high impact factors*. Nat. Immunol., 2001. **2**: p. 95.
165. Crump, M.P., et al., *Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1*. The EMBO Journal, 1997. **16**(23): p. 6996.
166. Szekanecz, Z. and A.E. Koch, *Chemokines and angiogenesis*. Curr. Opin. Rheumatol., 2001. **13**: p. 202.
167. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. **67**: p. 1033.
168. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**: p. 301.
169. Bleul, C.C., J.L. Schultze, and T.A. Springer, *B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement*. J. Exp. Med., 1998. **187**: p. 753.
170. Bowman, E.P., et al., *Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation*. J. Exp. Med., 2000. **191**: p. 1303.
171. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**: p. 595.
172. Dieu, M.C., et al., *Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites*. J. Exp. Med., 1998. **188**: p. 373.
173. Sallusto, F., et al., *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation*. Euro. J. Immunol., 1998. **28**: p. 2760.
174. Sozzani, S., et al., *Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties*. J. Immunol., 1998. **161**: p. 1083.
175. Cook, D.N., et al., *CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue*. Immunity, 2000. **12**: p. 495.
176. Gu, L., et al., *Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1*. Nature, 2000. **404**: p. 407.
177. Sodhi, A., S. Montaner, and J.S. Gutkind, *Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(12): p. 998.
178. Laing, K.J. and C.J. Secombes, *Chemokines*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 443-60.
179. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function and inhibition of chemokines*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2002. **42**(1): p. 469-499.
180. Kim, K.S., et al., *Structural characterization of a monomeric chemokine: monocyte chemoattractant protein-3*. FEBS Lett., 1996. **395**: p. 277.
181. Mizoue, L.S., et al., *Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 1402.
182. Lodi, P.J., et al., *High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR*. Science, 1994. **263**: p. 1762.
183. Kuloglu, E.S., et al., *Monomeric solution structure of the prototypical 'C' chemokine lymphotactin*. Biochemistry, 2001. **40**(42): p. 12486-96.
184. Handel, T.M. and P.J. Domaille, *Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer*. Biochemistry, 1996. **35**(21): p. 6569.
185. Booth, V., I. Clark-Lewis, and B.D. Sykes, *NMR structure of CXCR3 binding chemokine CXCL11 (ITAC)*. Protein Sci, 2004. **13**(8): p. 2022-8.
186. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 787-820.
187. Crow, M., et al., *Human recombinant interferon-inducible protein-10: intact disulfide bridges are not required for inhibition of hematopoietic progenitors and chemotaxis of T lymphocytes and monocytes*. J. Hematother. Stem Cell Res., 2001. **10**: p. 147.

188. Marcaurelle, L.A., et al., *Chemical synthesis of lymphotactin: a glycosylated chemokine with a C-terminal mucin-like domain*. Chemistry, 2001. **7**: p. 1129.
189. Zhang, X., et al., *Crystal structure of recombinant human platelet factor 4*. Biochemistry, 1994. **33**: p. 8361.
190. Malkowski, M.G., et al., *Crystal structure of recombinant human neutrophil-activating peptide-2 (M6L) at 1.9 Angstrom resolution*. J. Biol. Chem., 1995. **270**: p. 7088.
191. Baldwin, E.T., et al., *Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991. **88**: p. 502.
192. Dealwis, C., et al., *Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(12): p. 6941.
193. Fairbrother, W.J., et al., *The solution structure of melanoma growth stimulating activity*. J. Mol. Biol., 1994. **242**: p. 252.
194. Qian, Y.Q., K.O. Johanson, and P. McDevitt, *Nuclear magnetic resonance solution structure of truncated human GRObeta [5-73] and its structural comparison with CXC chemokine family members GROalpha and IL-8*. J. Mol. Biol., 1999. **294**: p. 1065.
195. Mayo, K.H., et al., *NMR solution structure of the 32-kDa platelet factor 4 ELR-motif N-terminal chimera: a symmetric tetramer*. Biochemistry, 1995. **34**: p. 11399.
196. Young, H., et al., *NMR structure and dynamics of monomeric neutrophil-activating peptide 2*. Biochem. J., 1999. **338**: p. 591.
197. Clore, M.G., et al., *Three dimensional structure of interleukin 8 in solution*. Biochemistry, 1990. **24**: p. 1689.
198. Lubkowski, J., et al., *The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions*. Nature Structural Biology, 1997. **4**(1): p. 64-69.
199. Blaszczyk, J., et al., *Complete crystal structure of monocyte chemotactic protein-2, a CC chemokine that interacts with multiple receptors*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 14075.
200. Fernandez, E.J., et al., *Comparison of the structure of vMIP-II with eotaxin-1, RANTES, and MCP-3 suggests a unique mechanism for CCR3 activation*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 12837.
201. Keizer, D.W., et al., *Human CC chemokine I-309, structural consequences of the additional disulfide bond*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 6053.
202. Czaplewski, L.G., et al., *Identification of Amino Acid Residues Critical for Aggregation of Human CC Chemokines Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta, and RANTES. Characterization of active disaggregated chemokine variants*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(23): p. 16077-16084.
203. Chung, C., et al., *The three-dimensional solution structure of RANTES*. Biochemistry, 1995. **34**: p. 9307.
204. Crump, M.P., et al., *Solution structure of eotaxin, a chemokine that selectively recruits eosinophils in allergic inflammation*. J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 22471.
205. Sticht, H., et al., *Solution structure of the human CC chemokine 2: a monomeric representative of the CC chemokine subtype*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 5995.
206. Rajarathnam, K., et al., *Solution structure and dynamics of myeloid progenitor inhibitory factor-1 (MPIF-1), a novel monomeric CC chemokine*. J. Biol. Chem., 2000. **276**: p. 4909.
207. Mayer, K.L. and M.J. Stone, *NMR solution structure and receptor peptide binding of the CC chemokine eotaxin-2*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 8382.
208. LiWang, A.C., et al., *Dynamics study on the anti-human immunodeficiency virus chemokine viral macrophage-inflammatory protein-II (VMIP-II) reveals a fully monomeric protein*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 442.
209. Hoover, D.M., et al., *The crystal structure of the chemokine domain of fractalkine shows a novel quaternary arrangement*. J. Biol. Chem., 2000. **275**: p. 23187.

210. Lubkowski, J., et al., *The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions*. Nat Struct Mol Biol, 1997. **4**(1): p. 64.
211. Kuloglu, E.S., et al., *Structural rearrangement of human lymphotactin, a C chemokine, under physiological solution conditions*. J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 17863-70.
212. Ren, M., et al., *Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme*. Embo J, 2010. **29**(23): p. 3952-66.
213. Tuinstra, R.L., et al., *Interconversion between two unrelated protein folds in the lymphotactin native state*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(13): p. 5057-62.
214. Covell, D.G., et al., *Analysis of hydrophobicity in the alpha and beta chemokine families and its relevance to dimerization*. Protein Sci., 1994. **3**: p. 2064.
215. Clore, G.M. and A.M. Gronenborn, *Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines*. FASEB J., 1995. **9**: p. 57.
216. Hoogewerf, A.J., et al., *Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines*. Biochemistry, 1997. **36**(44): p. 13570-8.
217. Lau, E.K., et al., *Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(21): p. 22294.
218. Skelton, N.J., et al., *Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type*. Biochemistry, 1995. **34**(16): p. 5329-42.
219. Paavola, C.D., et al., *Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B*. J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 33157.
220. Jansma, A.L., et al., *NMR analysis of the structure, dynamics, and unique oligomerization properties of the human chemokine CTACK/CCL27*. J Biol Chem, 2010.
221. Salanga, C.L. and T.M. Handel, *Chemokine oligomerization and interactions with receptors and glycosaminoglycans: The role of structural dynamics in function*. Experimental Cell Research, 2011. **317**(5): p. 590.
222. Burrows, S., et al., *Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveals it is a monomer at physiological concentrations*. Biochemistry, 1994. **33**: p. 12741.
223. Clark-Lewis, I., et al., *Structure-activity relationships of chemokines*. J. Leukoc. Biol., 1995. **57**: p. 703.
224. Hoogewerf, A.J., et al., *Glycosaminoglycans Mediate Cell Surface Oligomerization of Chemokines*. Biochemistry, 1997. **36**(44): p. 13570-13578.
225. Lee, S.P., et al., *Oligomerization of dopamine and serotonin receptors*. Neuropsychopharmacology, 2000. **23**: p. S32.
226. Laurence, J.S., et al., *CC chemokine MIP-1 beta can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding*. Biochemistry, 2000. **39**(12): p. 3401-3409.
227. Proudfoot, A.E.I., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(4): p. 1885.
228. Rajarathnam, K., et al., *Neutrophil activation by monomeric interleukin-8*. Science, 1994. **264**: p. 90.
229. von Hundelshausen, P., et al., *Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium*. Blood, 2005. **105**(3): p. 924-30.
230. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology*. Pharmacol. Rev., 2000. **52**: p. 145.
231. Horuk, R., *Chemokine receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(4): p. 313-35.
232. Lazennec, G. and A. Richmond, *Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation*. Trends Mol Med, 2010. **16**(3): p. 133-44.
233. Katancik, J.A., A. Sharma, and E. de Nardin, *Interleukin 8, neutrophil-activating peptide-2 and GRO-alpha bind to and elicit cell activation via specific and different amino acid residues of CXCR2*. Cytokine, 2000. **12**: p. 1480.

234. Blanpain, C., et al., *Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein*. J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 34719.
235. Howard, O.M., et al., *Naturally occurring CCR5 extracellular and transmembrane domain variants affect HIV-1 Co-receptor and ligand binding function*. J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 16228.
236. Zhou, N., et al., *Molecular modeling and site-directed mutagenesis of CCR5 reveal residues critical for chemokine binding and signal transduction*. Eur. J. Immunol., 2000. **30**: p. 164.
237. Blanpain, C., et al., *Extracellular cysteines of CCR5 are required for chemokine binding, but dispensable for HIV-1 coreceptor activity*. J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 18,902.
238. Samson, M., et al., *The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity*. J. Biol. Chem., 1997. **272**: p. 24,934.
239. Zhou, H. and H.H. Tai, *Characterization of recombinant human CXCR4 in insect cells: role of extracellular domains and N-glycosylation in ligand binding*. Arch. Biochem. Biophys., 1999. **369**: p. 267.
240. Proudfoot, A.E., et al., *Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist*. J. Biol. Chem., 1996. **271**: p. 2599.
241. Simmons, G., et al., *Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist*. Science, 1997. **276**: p. 276.
242. Struyf, S., et al., *Natural truncation of RANTES abolishes signaling through the CC chemokine receptors CCR1 and CCR3, impairs its chemotactic potency and generates a CC chemokine inhibitor*. Euro. J. Immunol., 1998. **28**: p. 1262.
243. Struyf, S., et al., *CD26/dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemotactic potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3*. J. Immunol., 1999. **162**: p. 4903.
244. Zhang, Y.J., B.J. Rutledge, and B.J. Rollins, *Structure/activity analysis of human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by mutagenesis*. J. Biol. Chem., 1994. **269**: p. 15918.
245. Steitz, S.A., et al., *Mapping of MCP-1 functional domains by peptide analysis and site-directed mutagenesis*. FEBS Lett., 1998. **430**: p. 158.
246. Weber, M., et al., *Deletion of the NH₂-terminal residue converts monocyte chemotactic protein 1 from an activator of basophil mediator release to an eosinophil chemoattractant*. J. Exp. Med., 1996. **183**: p. 681.
247. Schraufstatter, I.U., et al., *Multiple sites on IL-8 responsible for binding to alpha and beta IL-8 receptors*. J. Immunol., 1993. **151**: p. 6418.
248. Hammond, M.E., et al., *Receptor recognition and specificity of interleukin-8 is determined by residues that cluster near a surface-accessible hydrophobic pocket*. J. Biol. Chem., 1996. **271**: p. 8228.
249. Williams, G., et al., *Mutagenesis studies of interleukin-8*. J. Biol. Chem., 1996. **271**: p. 9579.
250. Beall, C.J., et al., *Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity*. Biochem. J., 1996. **313**: p. 633.
251. Hemmerich, S., et al., *Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 13,013.
252. Koopmann, W. and M.S. Krangel, *Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha*. J. Biol. Chem., 1997. **272**: p. 10103.
253. Koopmann, W., C. Ediriwickrema, and M.S. Krangel, *Structure and function of the glycosaminoglycan binding site of chemokine macrophage-inflammatory protein-1 beta*. J. Immunol., 1999. **163**: p. 2120.

254. Sadir, R., et al., *Characterization of the stromal cell-derived factor-1 alpha-heparin complex*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(11): p. 8288-8296.
255. Roby, P. and M. Page, *Cell-binding and growth-stimulating activities of the C-terminal part of human MGSA/Gro alpha*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995. **206**: p. 792.
256. Luo, J., et al., *Attachment of C-terminus of SDF-1 enhances the biological activity of its N-terminal peptide*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **264**(1): p. 42-7.
257. Middleton, J., et al., *Transcytosis and Surface Presentation of IL-8 by Venular Endothelial Cells*. Cell, 1997. **91**(3): p. 385.
258. Middleton, J., et al., *Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium*. Blood, 2002. **100**(12): p. 3853-60.
259. Witt, D.P. and A.D. Lander, *Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations*. Current Biology, 1994. **4**(5): p. 394.
260. Proudfoot, A.E.I., et al., *The BBXB Motif of RANTES Is the Principal Site for Heparin Binding and Controls Receptor Selectivity*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(14): p. 10620-10626.
261. Ali, S., et al., *A non-glycosaminoglycan-binding variant of CC chemokine ligand 7 (monocyte chemoattractant protein-3) antagonizes chemokine-mediated inflammation*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 1257-66.
262. O'Boyle, G., et al., *Anti-inflammatory therapy by intravenous delivery of non-heparan sulfate-binding CXCL12*. Faseb J, 2009. **23**(11): p. 3906-16.
263. Zabel, B.A., et al., *Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2207-20.
264. Schulte, A., et al., *Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by alpha- and gamma-secretases*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(1): p. 233-40.
265. Severin, I.C., et al., *Characterization of the chemokine CXCL11-heparin interaction suggests two different affinities for glycosaminoglycans*. J Biol Chem, 2010. **285**(23): p. 17713-24.
266. Rueda, P., et al., *The CXCL12 γ Chemokine Displays Unprecedented Structural and Functional Properties that Make It a Paradigm of Chemoattractant Proteins*. PLoS ONE, 2008. **3**(7): p. e2543.
267. Laguri, C., et al., *The novel CXCL12 γ isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4*. PLoS ONE, 2007. **2**(10): p. e1110.
268. Houshmand, P. and A. Zlotnik, *Therapeutic applications in the chemokine superfamily*. Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**(4): p. 457.
269. Baba, M., et al., *A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(10): p. 5698-5703.
270. Dragic, T., et al., *A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(10): p. 5639-5644.
271. Sabroe, I., et al., *A Small Molecule Antagonist of Chemokine Receptors CCR1 and CCR3*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(34): p. 25985-25992.
272. Howard, O.M.Z., et al., *Inhibition of in Vitro and in Vivo HIV Replication by a Distamycin Analogue That Interferes with Chemokine Receptor Function: A Candidate for Chemotherapeutic and Microbicidal Application*. Journal of Medicinal Chemistry, 1998. **41**(13): p. 2184.
273. Liang, M., et al., *Species selectivity of a small molecule antagonist for the CCR1 chemokine receptor*. European Journal of Pharmacology, 2000. **389**(1): p. 41.
274. Tashiro, K., et al., *Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins*. Science, 1993. **261**(5121): p. 600-3.

275. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 495.
276. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-638.
277. Ohnishi, Y., et al., *Crystal structure of recombinant native SDF-1 alpha with additional mutagenesis studies: An attempt at a more comprehensive interpretation of accumulated structure-activity relationship data*. Journal of Interferon and Cytokine Research, 2000. **20**(8): p. 691-700.
278. Holmes, W.D., et al., *Solution studies of recombinant human stromal-cell-derived factor-1*. Protein Expression and Purification, 2001. **21**(3): p. 367.
279. Lowman, H.B., et al., *Monomeric variants of IL-8: effects of side chain substitutions and solution conditions upon dimer formation*. Protein Sci, 1997. **6**(3): p. 598-608.
280. Laurence, J.S., A.C. LiWang, and P.J. LiWang, *Effect of N-terminal truncation and solution conditions on chemokine dimer stability: nuclear magnetic resonance structural analysis of macrophage inflammatory protein 1 beta mutants*. Biochemistry, 1998. **37**(26): p. 9346-54.
281. Nagasawa, T., et al., *Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14726-9.
282. Yu, L., et al., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1*. Gene, 2006. **374**: p. 174-9.
283. Janowski, M., *Functional diversity of SDF-1 splicing variants*. Cell Adh Migr, 2009. **3**(3): p. 243-9.
284. Gleichmann, M., et al., *Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(6): p. 1857-66.
285. Lortat-Jacob, H., *The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(5): p. 543-8.
286. De La Luz Sierra, M., et al., *Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2452.
287. Davis, D.A., et al., *Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1alpha in the circulation*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4561.
288. Lortat-Jacob, H., A. Grosdidier, and A. Imberty, *Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(3): p. 1229.
289. Sweeney, E.A., et al., *Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells*. Blood, 2002. **99**(1): p. 44.
290. Valenzuela-Fernandez, A., et al., *Optimal inhibition of X4 HIV isolates by the CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha requires interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(28): p. 26550-26558.
291. Amara, A., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(34): p. 23916.
292. Huang, X., et al., *Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor*. Biophys J, 2003. **84**(1): p. 171-84.
293. Laguri, C., F. Arenzana-Seisdedos, and H. Lortat-Jacob, *Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example*. Carbohydrate Research, 2008. **343**(12): p. 2018.

294. Brelot, A., et al., *Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities*. J. Biol. Chem., 2000. **275**: p. 23736.
295. Tran, P.B., et al., *Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells*. J Neurosci Res, 2004. **76**(1): p. 20-34.
296. Hesselgesser, J., et al., *Identification and characterization of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor*. J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 15687.
297. Suratt, B.T., et al., *Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis*. Blood, 2004. **104**(2): p. 565-71.
298. Gupta, S.K., et al., *Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4282-7.
299. Kollet, O., et al., *HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 160-9.
300. Ji, J.F., et al., *Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury*. Stem Cells, 2004. **22**(3): p. 415-27.
301. Ji, J.F., et al., *Expression of chemokine receptors CXCR4, CCR2, CCR5 and CX3CR1 in neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of the adult rat brain*. Neurosci Lett, 2004. **355**(3): p. 236-40.
302. Sehgal, A., et al., *CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells*. J Surg Oncol, 1998. **69**(2): p. 99-104.
303. Gupta, S.K. and K. Pillarisetti, *Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2368-72.
304. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35760-6.
305. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2201-13.
306. Law, N.M. and S.A. Rosenzweig, *Characterization of the G-protein linked orphan receptor GPRN1/RDC1*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **201**(1): p. 458-65.
307. Schonemeier, B., et al., *Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain*. J Comp Neurol, 2008. **510**(2): p. 207-20.
308. Schonemeier, B., et al., *Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain*. J Neuroimmunol, 2008. **198**(1-2): p. 39-45.
309. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(1): p. 6-15.
310. Braun, M., et al., *Xenopus laevis Stromal cell-derived factor 1: conservation of structure and function during vertebrate development*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2340-7.
311. McGrath, K.E., et al., *Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4*. Dev Biol, 1999. **213**(2): p. 442-56.
312. Bleul, C.C., et al., *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(3): p. 1101-1109.
313. Hesselgesser, J., et al., *CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons*. Curr Biol, 1997. **7**(2): p. 112-21.
314. Feil, C. and H.G. Augustin, *Endothelial cells differentially express functional CXCR-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): p. 38-45.

315. Yamaguchi, J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization*. *Circulation*, 2003. **107**(9): p. 1322-8.
316. Mohle, R., et al., *The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1*. *Blood*, 1998. **91**(12): p. 4523-30.
317. Lataillade, J.J., et al., *Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism*. *Blood*, 2002. **99**(4): p. 1117-29.
318. Kayali, A.G., et al., *The stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 ligand-receptor axis is critical for progenitor survival and migration in the pancreas*. *J Cell Biol*, 2003. **163**(4): p. 859-69.
319. Herbein, G., et al., *Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4*. *Nature*, 1998. **395**(6698): p. 189-94.
320. Corasaniti, M.T., et al., *Evidence that the HIV-1 coat protein gp120 causes neuronal apoptosis in the neocortex of rat via a mechanism involving CXCR4 chemokine receptor*. *Neurosci Lett*, 2001. **312**(2): p. 67-70.
321. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*. *Circ Res*, 2004. **95**(4): p. 343-53.
322. Shao, H., et al., *Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels*. *Stem Cells*, 2008. **26**(5): p. 1376-84.
323. Du, R., et al., *HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion*. *Cancer Cell*, 2008. **13**(3): p. 206-20.
324. Taichman, R.S., et al., *Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone*. *Cancer Res*, 2002. **62**(6): p. 1832-7.
325. Schrader, A.J., et al., *CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer*. *Br J Cancer*, 2002. **86**(8): p. 1250-6.
326. Koshiba, T., et al., *Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(9): p. 3530-5.
327. Kijima, T., et al., *Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(21): p. 6304-11.
328. Scotton, C.J., et al., *Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer*. *Cancer Research*, 2002. **62**(20): p. 5930.
329. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 50-56.
330. Zeelenberg, I.S., L. Ruuls-Van Stalle, and E. Roos, *The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases*. *Cancer Res*, 2003. **63**(13): p. 3833-9.
331. Murphy, P., *The molecular biology of leucocyte chemoattractant receptors*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 593-633.
332. Gerard, C. and N.P. Gerard, *C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 775-808.
333. Oppenheim, J.J., et al., *Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 617-48.
334. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(7): p. 436-45.
335. Rollins, B.J., *Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease*. *Mol Med Today*, 1996. **2**(5): p. 198-204.
336. Nelken, N.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(4): p. 1121-7.

337. Yla-Herttuala, S., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991. **88**: p. 5252.
338. Aukrust, P., et al., *Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure*. Circulation, 1998. **97**(12): p. 1136-43.
339. Hohensinner, P.J., et al., *Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) is expressed in human cardiac cells and is differentially regulated by inflammatory mediators and hypoxia*. FEBS Lett, 2006. **580**(14): p. 3532-8.
340. Koch, A.E., et al., *Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 772-9.
341. Hosaka, S., et al., *Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Immunol, 1994. **97**(3): p. 451-7.
342. Robinson, E., et al., *Chemokine expression in rheumatoid arthritis (RA): evidence of RANTES and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 beta production by synovial T cells*. Clin Exp Immunol, 1995. **101**(3): p. 398-407.
343. MacDermott, R.P., *Chemokines in the inflammatory bowel diseases*. J Clin Immunol, 1999. **19**(5): p. 266-72.
344. Leonard, E.J. and T. Yoshimura, *Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)*. Immunology Today, 1990. **11**: p. 97.
345. Mo, J.S., et al., *Role and regulation of IL-8 and MCP-1 in LPS-induced uveitis in rabbits*. Exp Eye Res, 1999. **68**(3): p. 333-40.
346. Tuailon, N., et al., *MCP-1 expression in endotoxin-induced uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(5): p. 1493-8.
347. Yoshida, Y., et al., *Positive correlation between pigment epithelium-derived factor and monocyte chemoattractant protein-1 levels in the aqueous humour of patients with uveitis*. Br J Ophthalmol, 2007. **91**(6): p. 737-8.
348. Proudfoot, A.E., *Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 106-15.
349. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
350. Izikson, L., et al., *Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1075-80.
351. Huang, D.R., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 713-26.
352. Clark-Lewis, I., et al., *Structure-activity relationships of chemokines*. Journal of Leukocyte Biology, 1995. **57**(5): p. 703-711.
353. Paolini, J.F., et al., *The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations [published erratum appears in J Immunol 1996 Apr 15;156(8):following 3088]*. The Journal of Immunology, 1994. **153**(6): p. 2704-2717.
354. Paolini Jf, W.D.C.T.L.M.K.M.S., *The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations*. The Journal of Immunology, 1996. **156**(8): p. 3089a.
355. Handel, T.M., et al., *An engineered monomer of CCL2 has anti-inflammatory properties emphasizing the importance of oligomerization for chemokine activity in vivo*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(4): p. 1101-8.
356. Shahrara, S., et al., *Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 ameliorates rat adjuvant-induced arthritis*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3447-56.
357. Crown, S.E., et al., *Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycan binding*. The Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(35): p. 25438.
358. Schenauer, M.R. and J.A. Leary, *An Ion Mobility-Mass Spectrometry Investigation of Monocyte Chemoattractant Protein-1*. Int J Mass Spectrom, 2009. **287**(1-3): p. 70-76.

359. Yu, Y., et al., *Chemokine-glycosaminoglycan binding: specificity for CCR2 ligand binding to highly sulfated oligosaccharides using FTICR mass spectrometry*. The Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(37): p. 32200.
360. Jarnagin, K., et al., *Identification of Surface Residues of the Monocyte Chemotactic Protein 1 That Affect Signaling through the Receptor CCR2*. Biochemistry, 1999. **38**(49): p. 16167.
361. Hemmerich, S., et al., *Identification of Residues in the Monocyte Chemotactic Protein-1 That Contact the MCP-1 Receptor, CCR2*. Biochemistry, 1999. **38**(40): p. 13013.
362. Monteclaro, F.S. and I.F. Charo, *The Amino-terminal Extracellular Domain of the MCP-1 Receptor, but Not the RANTES/MIP-1 alpha Receptor, Confers Chemokine Selectivity*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(32): p. 19084-19092.
363. Monteclaro, F.S. and I.F. Charo, *The Amino-terminal Domain of CCR2 Is Both Necessary and Sufficient for High Affinity Binding of Monocyte Chemoattractant Protein 1*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(37): p. 23186-23190.
364. Chakravarty, L., et al., *Lysine 58 and histidine 66 at the C-terminal alpha-helix of monocyte chemoattractant protein-1 are essential for glycosaminoglycan binding*. The Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(45): p. 29641.
365. Piccinini, A.M., et al., *Rationally Evolving MCP-1/CCL2 into a Decoy Protein with Potent Anti-inflammatory Activity in Vivo*. Journal of Biological Chemistry. **285**(12): p. 8782-8792.
366. Yu, Y., et al., *Potential inhibitors of chemokine function: analysis of noncovalent complexes of CC chemokine and small polyanionic molecules by ESI FT-ICR mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(4): p. 524.
367. Schenauer, M.R., et al., *CCR2 chemokines bind selectively to acetylated heparan sulfate octasaccharides*. J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25182-8.
368. Fong, T.A. and T.R. Mosmann, *Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines*. J Immunol, 1990. **144**(5): p. 1744-52.
369. Devos, R., et al., *Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(8): p. 2487-501.
370. Naylor, S.L., et al., *Human immune interferon gene is located on chromosome 12*. J Exp Med, 1983. **157**(3): p. 1020-7.
371. Yip, Y.K., et al., *Molecular weight of human gamma interferon is similar to that of other human interferons*. Science, 1982. **215**(4531): p. 411-3.
372. Yip, Y.K., et al., *Purification of two subspecies of human gamma (immune) interferon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 1820-4.
373. Kelker, H.C., et al., *Three molecular weight forms of natural human interferon-gamma revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody*. J Biol Chem, 1984. **259**(7): p. 4301-4.
374. Rinderknecht, E., B.H. O'Connor, and H. Rodriguez, *Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation*. The Journal of Biological Chemistry, 1984. **259**(11): p. 6790.
375. Sarenava, T., et al., *Biosynthesis and N-glycosylation of human interferon-gamma. Asn25 and Asn97 differ markedly in how efficiently they are glycosylated and in their oligosaccharide composition*. Eur J Biochem, 1996. **242**(2): p. 191-200.
376. Ealick, S.E., et al., *Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma*. Science (New York, N.Y.), 1991. **252**(5006): p. 698.
377. Nacheva, G., et al., *Human interferon gamma: significance of the C-terminal flexible domain for its biological activity*. Arch Biochem Biophys, 2003. **413**(1): p. 91-8.
378. Trinchieri, G. and B. Perussia, *Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects*. Immunology Today, 1985. **6**(4): p. 131.
379. Döbeli, H., et al., *Role of the carboxy-terminal sequence on the biological activity of human immune interferon (IFN-[gamma])*. Journal of Biotechnology, 1988. **7**(3): p. 199.

380. Curling, E.M., et al., *Recombinant human interferon-gamma. Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture.* Biochem J, 1990. **272**(2): p. 333-7.
381. Jarpe, M.A. and H.M. Johnson, *Structure of an epitope in an immunodominant region of the interferon-gamma molecule that is involved in receptor interaction.* J Interferon Res, 1990. **10**(2): p. 243-52.
382. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma.* Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
383. Ijzermans, J.N. and R.L. Marquet, *Interferon-gamma: a review.* Immunobiology, 1989. **179**(4-5): p. 456-73.
384. Williams, J.G., G.J. Jurkovich, and R.V. Maier, *Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine.* J Surg Res, 1993. **54**(1): p. 79-93.
385. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma.* Annual Review of Immunology, 1997. **15**(1): p. 749-795.
386. Leon, M.L. and S.H. Zuckerman, *Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis.* Inflamm Res, 2005. **54**(10): p. 395-411.
387. Ghosh, S., et al., *Interfering with interferons in inflammatory bowel disease.* Gut, 2006. **55**(8): p. 1071-3.
388. Skurkovich, B. and S. Skurkovich, *Anti-interferon-gamma antibodies in the treatment of autoimmune diseases.* Curr Opin Mol Ther, 2003. **5**(1): p. 52-7.
389. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.* Journal of Leukocyte Biology, 2004. **75**(2): p. 163.
390. Anderson, P., Y.K. Yip, and J. Vilcek, *Specific binding of 125I-human interferon-gamma to high affinity receptors on human fibroblasts.* J Biol Chem, 1982. **257**(19): p. 11301-4.
391. Greenlund, A.C., et al., *Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91).* Embo J, 1994. **13**(7): p. 1591-600.
392. Perez Sanchez, H., et al., *Organization of human interferon gamma-heparin complexes from solution properties and hydrodynamics.* Biochemistry, 2006. **45**(44): p. 13227-38.
393. Robert M. Stroud, J.A.W., *Mechanistic Diversity of Cytokine Receptor Signaling Across Cell Membranes.* Sci. STKE, 2004. **2004**(231).
394. Fountoulakis, M., et al., *Stoichiometry of interaction between interferon gamma and its receptor.* Eur J Biochem, 1992. **208**(3): p. 781-7.
395. Lundell, D.L. and S.K. Narula, *Structural elements required for receptor recognition of human interferon-gamma.* Pharmacol Ther, 1994. **64**(1): p. 1-21.
396. Sadir, R., E. Forest, and H. Lortat-Jacob, *The heparan sulfate binding sequence of interferon-gamma increased the on rate of the interferon-gamma-interferon-gamma receptor complex formation.* J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 10919-25.
397. Walter, M.R., et al., *Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor.* Nature, 1995. **376**(6537): p. 230-5.
398. Sakatsume, M., et al., *The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors.* J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17528-34.
399. Levy, D.E., *Interferon induction of gene expression through the Jak-Stat pathway.* Seminars in Virology, 1995. **6**(3): p. 181.
400. Briscoe, J., et al., *JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1996. **351**(1336): p. 167-71.
401. Briscoe, J., et al., *Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state.* Embo J, 1996. **15**(4): p. 799-809.
402. Greenlund, A.C., et al., *Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process.* Immunity, 1995. **2**(6): p. 677-87.

403. Pellegrini, S. and C. Schindler, *Early events in signalling by interferons*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(9): p. 338-42.
404. Vanhaverbeke, C., et al., *NMR characterization of the interaction between the C-terminal domain of interferon-gamma and heparin-derived oligosaccharides*. The Biochemical Journal, 2004. **384**(Pt 1): p. 93.
405. Lortat-Jacob, H. and J.A. Grimaud, *Binding of interferon-gamma to heparan sulfate is restricted to the heparin-like domains and involves carboxylic--but not N-sulfated--groups*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1117**(2): p. 126-30.
406. Lortat-Jacob, H., F. Baltzer, and J.-A. Grimaud, *Heparin Decreases the Blood Clearance of Interferon-gamma and Increases Its Activity by Limiting the Processing of Its Carboxyl-terminal Sequence*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(27): p. 16139-16143.
407. Lortat-Jacob, H., J.E. Turnbull, and J.A. Grimaud, *Molecular organization of the interferon gamma-binding domain in heparan sulphate*. Biochem J, 1995. **310** (Pt 2): p. 497-505.
408. Kakehi, K., Y. Oda, and M. Kinoshita, *Fluorescence polarization: Analysis of carbohydrate-protein interaction*. Analytical Biochemistry, 2001. **297**(2): p. 111-116.
409. Khan, M.I., et al., *Fluorescence-Polarization Studies On Binding Of 4-Methylumbelliferyl Beta-D-Galactopyranoside To Ricinus-Communis (Castor-Bean) Agglutinin*. Biochemical Journal, 1980. **191**(2): p. 395-400.
410. Khan, M.I., et al., *Fluorescence Polarization As A Tool To Study Lectin-Sugar Interaction - An Investigation Of The Binding Of 4-Methylumbelliferyl Beta-D-Galactopyranoside To Abrus-Precautorious Agglutinin*. European Journal of Biochemistry, 1981. **115**(1): p. 149-152.
411. Mizuno, M., et al., *Interaction assay of oligosaccharide with lectins using glycosylasparagine*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004. **14**(2): p. 485-490.
412. Sorme, P., et al., *Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions*. Analytical Biochemistry, 2004. **334**(1): p. 36.
413. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics, 2005. **1751**(2): p. 119-139.
414. Tylercross, R., et al., *Heparin-Binding Domain Peptides Of Antithrombin-III - Analysis By Isothermal Titration Calorimetry And Circular-Dichroism Spectroscopy*. Protein Science, 1994. **3**(4): p. 620-627.
415. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis*. Analytical Biochemistry, 2007. **361**(1): p. 1.
416. Harding, S.E. and B.Z. Chowdhry, *Protein-Ligand interactions: structure and spectroscopy*. Vol. 2. 2001: Oxford University press.
417. Harding, S.E. and B.Z. Chowdhry, *Protein-Ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry*. 2001: Oxford University press.
418. Murphy, J.W., et al., *Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin*. The Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(13): p. 10018.
419. Siebert, H.C., et al., *Analysis of Protein-Carbohydrate Interaction at the Lower Size Limit of the Protein Part (15-Mer Peptide) by NMR Spectroscopy, Electrospray Ionization Mass Spectrometry, and Molecular Modeling*. Biochemistry, 2002. **41**(30): p. 9707-9717.
420. Hayashida, M., et al., *Similarity between Protein-Protein and Protein-Carbohydrate Interactions, Revealed by Two Crystal Structures of Lectins from the Roots of Pokeweed*. Journal of Molecular Biology, 2003. **334**(3): p. 551.
421. Colfen, H., et al., *A study by analytical ultracentrifugation on the interaction between lysozyme and extensively deacetylated chitin (chitosan)*. Carbohydrate Polymers, 1996. **30**(1): p. 45-53.

422. Burnouf, T. and M. Radosevich, *Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2001. **49**(1-3): p. 575-586.
423. Lebowitz, J., M.S. Lewis, and P. Schuck, *Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review*. Protein Science, 2002. **11**(9): p. 2067-2079.
424. Laue, T.M. and W.F. Stafford, *Modern applications of analytical ultracentrifugation*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1999. **28**: p. 75-100.
425. Feizi, T., et al., *Carbohydrate microarrays -- a new set of technologies at the frontiers of glycomics*. Current Opinion in Structural Biology, 2003. **13**(5): p. 637-645.
426. Fukui, S., et al., *Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions*. Nature Biotechnology, 2002. **20**(10): p. 1011.
427. Kohlraush, F., Ann. Phy. Chem., 1897(62): p. 209.
428. Du, Y. and E.K. Wang, *Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis with electrochemical and electrochemiluminescence detection*. Journal Of Separation Science, 2007. **30**(6): p. 875-890.
429. Garcia-Campana, A.M., M. Taverna, and H. Fabre, *LIF detection of peptides and proteins in CE*. Electrophoresis, 2007. **28**(1-2): p. 208-232.
430. Lin, Y.W., T.C. Chiu, and H.T. Chang, *Laser-induced fluorescence technique for DNA and proteins separated by capillary electrophoresis*. Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences, 2003. **793**(1): p. 37-48.
431. Hashimoto, M., et al., *Chemiluminescence detection of heme proteins separated by capillary isoelectric focusing*. Journal of Chromatography A, 1999. **852**(2): p. 597-601.
432. Jorgenson, J.W., Lukacs, K. D., *Capillary zone electrophoresis*. Science, **1983**. **222**: p. 266-272.
433. Guttman, A., *Capillary sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis of proteins*. Electrophoresis, 1996. **17**(8): p. 1333-1341.
434. Rodriguez-Diaz, R., T. Wehr, and M.D. Zhu, *Capillary isoelectric focusing*. Electrophoresis, 1997. **18**(12-13): p. 2134-2144.
435. Kasicka, V., *Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides*. Electrophoresis, 2006. **27**(1): p. 142-175.
436. Heegaard, N.H.H., S. Nilsson, and N.A. Guzman, *Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments*. Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications, 1998. **715**(1): p. 29-54.
437. Schou, C. and N.H.H. Heegaard, *Recent applications of affinity interactions in capillary electrophoresis*. ELECTROPHORESIS, 2006. **27**(1): p. 44.
438. Gayton-Ely, M., T. Pappas, and L. Holland, *Probing affinity via capillary electrophoresis: advances in 2003-2004*. Analytical And Bioanalytical Chemistry, 2005. **382**(3): p. 570-580.
439. He, X.Y., et al., *Recent advances in the study of biomolecular interactions by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2004. **25**(4-5): p. 697-711.
440. Tanaka, Y. and S. Terabe, *Estimation of binding constants by capillary electrophoresis*. Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences, 2002. **768**(1): p. 81-92.
441. Rundlett, K.L. and D.W. Armstrong, *Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(7): p. 1419-1427.
442. Guijt-van Duijn, R.M., et al., *Recent advances in affinity capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2000. **21**(18): p. 3905-3918.
443. Heegaard, N.H.H. and R.T. Kennedy, *Identification, quantitation, and characterization of biomolecules by capillary electrophoretic analysis of binding interactions*. Electrophoresis, 1999. **20**(15-16): p. 3122-3133.
444. Busch, M.H.A., J.C. Kraak, and H. Poppe, *Principles and limitations of methods available for the determination of binding constants with affinity capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1997. **777**(2): p. 329.

445. Le Saux, T., et al., *Determination of the binding parameters for antithrombin-heparin fragment systems by affinity and frontal analysis continuous capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2006. **1132**(1-2): p. 289.
446. Fermas, S., R. Daniel, and F. Gonnet, *The polyethylene oxide capillary coating is compatible with capillary electrophoresis-mass spectrometry analysis of basic proteins*. Analytical Biochemistry, 2008. **372**(2): p. 258.
447. Fermas, S., et al., *Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL 12) are coupled as evidenced by affinity CE-MS analysis*. Glycobiology, 2008. **18**(12): p. 1054.
448. Fermas, S., et al., *Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(13): p. 4987.
449. Busch, M.H.A., J.C. Kraak, and H. Poppe, *Cellulose acetate-coated fused-silica capillaries for the separation of proteins by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1995. **695**(2): p. 287.
450. Yang, C.M. and Z. El Rassi, *Capillary zone electrophoresis of proteins with fused-silica capillaries having polymers and surfactants adsorbed onto surfactant moieties previously covalently bound to the capillary column surface*. Electrophoresis, 1998. **19**(13): p. 2278-2284.
451. Le Saux, T., *Détermination des paramètres d'interaction non-covalente en solution par les méthodes électrophorétiques capillaires. Champ d'application et performances. Rationalisation des protocoles.*, in *ED 0388: Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre*. 2004, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris.
452. Kimber L. Rundlett, D.W.A., *Methods for the estimation of binding constants by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 1997. **18**(12-13): p. 2194-2202.
453. Manisali, I., D.D.Y. Chen, and B.B. Schneider, *Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future*. Trac-Trends In Analytical Chemistry, 2006. **25**(3): p. 243-256.
454. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(7): p. 804.
455. Vékey, K., *Multiply charged ions*. Mass Spectrometry Reviews, 1995. **14**(3): p. 195.
456. Akashi, S., *Investigation of molecular interaction within biological macromolecular complexes by mass spectrometry*. Medicinal Research Reviews, 2006. **26**(3): p. 339-368.
457. Albert J. R. Heck, R.H.H.v.d.H., *Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 2004. **23**(5): p. 368-389.
458. Loo, J.A., *Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 1997. **16**(1): p. 1-23.
459. Pramanik, B.N., et al., *Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: an emerging technology*. Journal of Mass Spectrometry, 1998. **33**(10): p. 911-920.
460. Shields, S.J., et al., *Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(5): p. 460.
461. Veenstra, T.D., *Electrospray ionization mass spectrometry in the study of biomolecular non-covalent interactions*. Biophysical Chemistry, 1999. **79**(2): p. 63-79.
462. Wang, W., E.N. Kitova, and J.S. Klassen, *Nonspecific Protein-Carbohydrate Complexes Produced by Nanoelectrospray Ionization. Factors Influencing Their Formation and Stability*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(10): p. 3060-3071.
463. Wang, W., E.N. Kitova, and J.S. Klassen, *Influence of Solution and Gas Phase Processes on Protein-Carbohydrate Binding Affinities Determined by Nanoelectrospray Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(19): p. 4945-4955.

464. Olivares, J.A., et al., *Online Mass-Spectrometric Detection For Capillary Zone Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(8): p. 1230-1232.
465. *Installing the Agilent CE ESI-MS Sprayer Kit (G1607A)*. Agilent Technologies.
466. Smith, R.D., et al., *Capillary electrophoresis/mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(13): p. 574A.
467. Tetler, L.W., P.A. Cooper, and B. Powell, *Influence of capillary dimensions on the performance of a coaxial capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry interface*. Journal of Chromatography A, 1995. **700**(1-2): p. 21.
468. Palmer, M.E., L.W. Tetler, and I.D. Wilson, *Hydrogen/deuterium exchange using a coaxial sheath-flow interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2000. **14**(9): p. 808-817.
469. Smith, R.D. and H.R. Udseth, *Capillary zone electrophoresis-MS*. Nature, 1988. **331**(6157): p. 639.
470. Zheng, J., et al., *Development of capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of lamotrigine in human plasma*. ELECTROPHORESIS, 2004. **25**(13): p. 2033.
471. Cherkaoui, S. and J.-L. Veuthey, *Nonaqueous capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the analysis of fluoxetine and its related compounds*. ELECTROPHORESIS, 2002. **23**(3): p. 442.
472. Tran, N.T., et al., *Poly(ethylene oxide) facilitates the characterization of an affinity between strongly basic proteins with DNA by affinity capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2005. **26**(16): p. 3105-3112.
473. Iki, N. and E.S. Yeung, *Non-bonded poly(ethylene oxide) polymer-coated column for protein separation by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1996. **731**(1-2): p. 273-282.
474. Martine, P., P. Gabriel, and D. Stephanie, *Use of quasi-isoelectric buffers as anolyte and catholyte to improve capillary isoelectric focusing performances*. ELECTROPHORESIS, 2008. **29**(8): p. 1687-1693.
475. Baryshnikova, O.K. and B.D. Sykes, *Backbone dynamics of SDF-1 alpha determined by NMR: Interpretation in the presence of monomer-dimer equilibrium*. Protein Science, 2006. **15**(11): p. 2568-2578.
476. Fermas, S., *Apport du couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse pour l'étude de complexes protéines / oligosaccharides*. 2007, Evry-Val-d'Essonne.
477. Brenner-Weiss, G., et al., *Analysis of non-covalent protein complexes by capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2003. **1009**(1-2): p. 147-153.
478. Sweeney, M.D., Y. Yu, and J.A. Leary, *Effects of sulfate position on heparin octasaccharide binding to CCL2 examined by tandem mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(8): p. 1114.
479. Meissen, J.K., et al., *Differentiation of 3-O-Sulfated Heparin Disaccharide Isomers: Identification of Structural Aspects of the Heparin CCL2 Binding Motif*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(4): p. 652.

COMMUNICATIONS

Communications écrites

- Determination of the heparin sulfation pattern required for the dimerization of Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) using heparin based synthetic oligosaccharides and ACE-MS analysis. Mehdi Prull-Janssen, Florence Gonnet, Cédric Przybylski, David Bonnaffé, Yaël hersant, Régis Daniel. (Article en préparation)
- Oligomerization of MCP-1 upon GAGs binding studied by ACE-MS. Mehdi Prull-Janssen, Florence Gonnet, Cédric Przybylski, David Bonnaffé, Yaël hersant, Régis Daniel. (Article en préparation)
- Isoelectric point of interferon gamma determined by CIEF-MS. Meriem Mokaddem, Mehdi Prull-Janssen, Anne Varenne, Régis Daniel. (Article en préparation)

Communication orale

- Analyse par CE et CE-MS de la liaison chimiokine/glycosaminoglycanes comme cible de l'action de polysaccharides sulfatés bioactifs extrait d'algues marines. Chimie pour le développement durable, RDR1, Colloque final, INRA de Versailles, Septembre 2009.

Communication sous forme de poster

- **Etude Protéomique : activation et régulation de la voie alternative du système du complément.** M. Le Mignon, F. Gonnet, D. Pflieger, M. Prull-Janssen, B. Sclavi, R. Daniel, 24èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Pau (France), 17-20 Septembre 2007.
- **Dimérisation de la protéine SDF-1 induite par la liaison d'oligosaccharide sulfaté d'héparine mise en évidence par EC-MS:** S. Fermas, F. Gonnet, N. Charnaux, B. Mulloy, F. Baleux, M. Prull-Janssen, R. Daniel; 25èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Grenoble, 8-11 Septembre 2008.
- **Evaluation par EC et EC-MS des interactions entre une bibliothèque d'oligosaccharides sulfatés d'héparines synthétiques et la chimiokine SDF-1.** M. Prull-Janssen, F. Gonnet, C. Przybylski, D. Bonnaffé, R. Daniel. 26^{èmes} journées du groupe français de Spectrométrie de Masse, SMAP, Dijon, Septembre 2009.
- **Comprendre et caractériser les interactions entre chimiokines et glycosaminoglycanes.** M. Prull-Janssen. Doctoriales, Rambouillet, Février 2010.

- **Affinity Capillary Electrophoresis On-line Coupled With Electrospray Ionization Mass Spectrometry To Probe The Oligomerization State of Chemokines Upon GAGs Binding.** Mehdi Prull-Janssen, Florence Gonnet, Cédric Przybylski, David Bonnaffé, Yaël Hersant, Régis Daniel. 59th ASMS Conference, Denver, USA, Juin 2011.
- **Etude de l'état d'oligomérisation de chimiokines induite par des glycosaminoglycanes par Electrophorèse Capillaire d'Affinité couplée à la Spectrométrie de Masse Electrospray (ACE-ESI/MS).** Mehdi Prull-Janssen, Florence Gonnet, Cédric Przybylski, David Bonnaffé, Yaël Hersant, Régis Daniel. SMAP 2011, Avignon, Septembre 2011.

RESUME

Les interactions non covalentes entre cytokines et glycosaminoglycanes interviennent dans de nombreux processus physiologiques, tels que la signalisation et la reconnaissance cellulaire, mais également dans des processus pathologiques tels que les infections virales ou bactériennes ainsi que dans certains processus cancéreux. Il apparaît essentiel, d'un point de vue fondamental et pour des applications thérapeutiques, de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ces interactions. A cette fin, le couplage entre l'électrophorèse capillaire (CE) et la spectrométrie de masse par ionisation electrospray (ESI-MS) s'est révélée être une méthode de choix pour l'étude des interactions non covalentes, avec la caractérisation des différents complexes formés en termes de stœchiométrie et de données thermodynamiques (constantes de dissociation K_d). Cette approche a également bénéficié de l'utilisation d'oligosaccharides de synthèse de type héparine, ce qui a permis pour la première fois de mettre en évidence les déterminants structuraux des oligosaccharides sulfatés impliqués dans l'interaction avec les protéines cibles. Cette étude a concerné les deux chimiokines SDF-1 α et MCP-1, pour lesquelles les bases d'une relation structure-activité de liaison ont pu être établies. Enfin, nous avons également mis en œuvre des premiers essais d'une stratégie de « ligand fishing » avec l'interféron gamma humain (IFN γ) dans le but de déterminer les ligands oligosaccharidiques mis en jeu.

Mots clés : Spectrométrie de masse ; électrophorèse capillaire ; SDF-1 ; MCP-1 ; interféron gamma ; glycosaminoglycanes.

ABSTRACT

The non-covalent interactions between cytokines and glycosaminoglycans are involved in many physiological processes such as cell signaling and recognition, but also in pathological processes such as viral or bacterial infections and in certain cancer processes. From a fundamental point of view and for therapeutic applications, it is essential to understand the molecular mechanisms involved in these interactions. For this purpose, the hyphenation between capillary electrophoresis (CE) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) has emerged as a preferred method for the study of non-covalent interactions with the characterization of complexes in terms of stoichiometry and thermodynamic data (dissociation constants K_d). This approach has also benefited from the use of synthetic heparin-like oligosaccharides, which allowed for the first time to identify the sulfated oligosaccharides structural determinants involved in the interaction with target proteins. This study involved two chemokines SDF-1 α and MCP-1, for which the structure-binding activity foundations have been established. Finally, we also implemented the first experiments of a "ligand fishing" strategy with the human gamma interferon (IFN γ) to determine the oligosaccharide ligands involved.

Key words: mass spectrometry; capillary electrophoresis; SDF-1 α ; MCP-1; gamma interferon; glycosaminoglycans.

