

# L'agrécan et le cartilage articulaire : apport des glycosyltransférases dans la réparation du cartilage arthrosique

Jacques Magdalou, Patrick Netter, Sylvie Fournel-Gigleux et Mohamed Ouzzine

UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré-Nancy 1 « Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires »,  
Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

Auteur correspondant : Jacques Magdalou, [Jacques.Magdalou@medecine.uhp-nancy.fr](mailto:Jacques.Magdalou@medecine.uhp-nancy.fr)

Reçu le 25 mars 2008

**Résumé** – L'arthrose, la maladie la plus fréquente du système musculo-squelettique, est la conséquence de processus mécaniques et biologiques qui rompent l'homéostasie du cartilage, de la synoviale et de l'os sous-chondral. Dans le but de développer de nouvelles thérapies efficaces, visant à restaurer la matrice cartilagineuse, nous caractérisons les mécanismes moléculaires et les protéines-clés responsables de l'initiation de la maladie. Un des événements les plus précoces est la dégradation de l'agrécan qui est le protéoglycane matriciel le plus abondant. Les chaînes de chondroïtine sulfate liées à la protéine porteuse sont découpées en petits fragments. Le laboratoire s'intéresse aux glycosyltransférases qui catalysent la formation des chaînes polysaccharidiques, en particulier celles impliquées dans la synthèse de l'amorce tétrasaccharidique commune de liaison à la protéine porteuse, GlcA $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Xyl-O-Sérine. La galactose  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransférase-I (GlcAT-I), qui attache l'acide glucuronique terminal et qui est fortement réprimée durant l'arthrose, est une cible potentiellement intéressante. En effet, l'enzyme recombinante humaine joue un rôle primordial dans la synthèse des glycosaminoglycans (GAG). La surexpression de la GlcAT-I dans des explants de cartilage traités par l'IL1 $\beta$  est capable de s'opposer complètement à la déplétion en protéoglycans provoquées par cette cytokine pro-inflammatoire. Des études structure/fonction/régulation de cette enzyme ont alors été entreprises. Les résultats constituent les bases pour le développement de plusieurs thérapies basées sur la vectorisation de gènes en intra-articulaire et la conception de glyco-mimétiques capables de réparer le cartilage.

**Mots clés** : Cartilage / agrécan / glycosyltransférases / arthropathies

**Abstract** – Agrecan and articular cartilage: assessment of glycosyltransferases for the restoration of cartilage matrix in osteoarthritis.

Articular cartilage is a connective tissue containing a single type of cells, chondrocytes, which synthesise a dense extracellular matrix, mainly composed of collagens, hyaluronic acid and proteoglycans. These macromolecules play a major role in the resistance and elastic properties of the tissue. They also favour interactions with small active substances, such as growth factors and cytokines. Chondrocytes have a low metabolic capacity in relatively hypoxic conditions and absence of vascular supply. In physiopathological conditions, such as osteoarthritis (OA), progressive and irreversible degradation of matrix components is occurring. With the aim of developing new and efficient therapies against OA, we investigated the molecular mechanisms that initiate the disease, in order to identify key-proteins. These targets should hopefully lead to the design of new drugs able to stop degradation and restore cartilage. One of the earliest molecular events in OA is the degradation of agrecan, the most abundant proteoglycan. The glycosaminoglycan (GAG) chains, chondroitin-sulfate, attached on the core protein, are

subjected to hydrolysis into smaller fragments. We were interested in the glycosyltransferases that catalyse the formation of the polysaccharidic chains, namely those involved in the common tetrasaccharidic protein linkage region, GlcA $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Xyl-O-Serine. The galactose  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferase-I (GlcAT-I) which catalyses the final step of this primer and which is markedly repressed during OA is an attractive target in that respect. Indeed, the human recombinant enzyme was found to play a pivotal role in GAG synthesis. Moreover, overexpression of GlcAT-I in cartilage explants treated with IL1 $\beta$  was able to fully counteract proteoglycan depletion induced by the cytokine. These results prompted us to investigate the structure, function and regulation of this enzyme. This study provides the basis for several therapy approaches (gene delivery, design of glycomimetics able to initiate GAG synthesis) to promote cartilage repair.

**Key words:** Cartilage / aggrecan / glycosyltransferases / arthropathies

## Le cartilage articulaire et l'arthrose

Le cartilage est un tissu conjonctif résistant, dense et élastique généralement situé à la jonction entre de nombreuses pièces osseuses de notre squelette. Il présente plusieurs particularités : c'est un tissu avasculaire, non innervé et composé d'un seul type de cellules, les chondrocytes. Ceux-ci possèdent toute la machinerie enzymatique pour assurer la biosynthèse d'une matrice extracellulaire composée principalement de macromolécules protéiques et polysaccharidiques, les collagènes et les protéoglycanes (PG), respectivement. Cette matrice cartilagineuse constitue un réseau tissulaire hautement spécialisé : elle est responsable des propriétés mécaniques du cartilage (amortissement aux chocs dus au mouvement) ; c'est également un lieu privilégié d'échanges et d'interactions de petites molécules jouant des rôles-clés dans l'homéostasie du tissu, tels les facteurs de croissance ou les cytokines.

Le cartilage est présent dans de nombreuses parties du corps (cloison nasale, oreille externe, épiglotte, bronche et trachée, ...). Cependant, le cartilage articulaire qui recouvre les surfaces de frottement des articulations est le cartilage le mieux caractérisé en termes de structure et de fonction, étant donné le nombre de pathologies invalidantes, regroupées sous le nom de rhumatismes, liées à son dysfonctionnement (pathologies articulaires telles l'arthrose, l'arthrite, la polyarthrite rhumatoïde...). En particulier, les événements et mécanismes moléculaires responsables de la dégradation du cartilage sont de mieux en mieux connus et servent de base pour le développement de nouvelles thérapeutiques et stratégies chondroprotectrices.

### Structure du cartilage articulaire

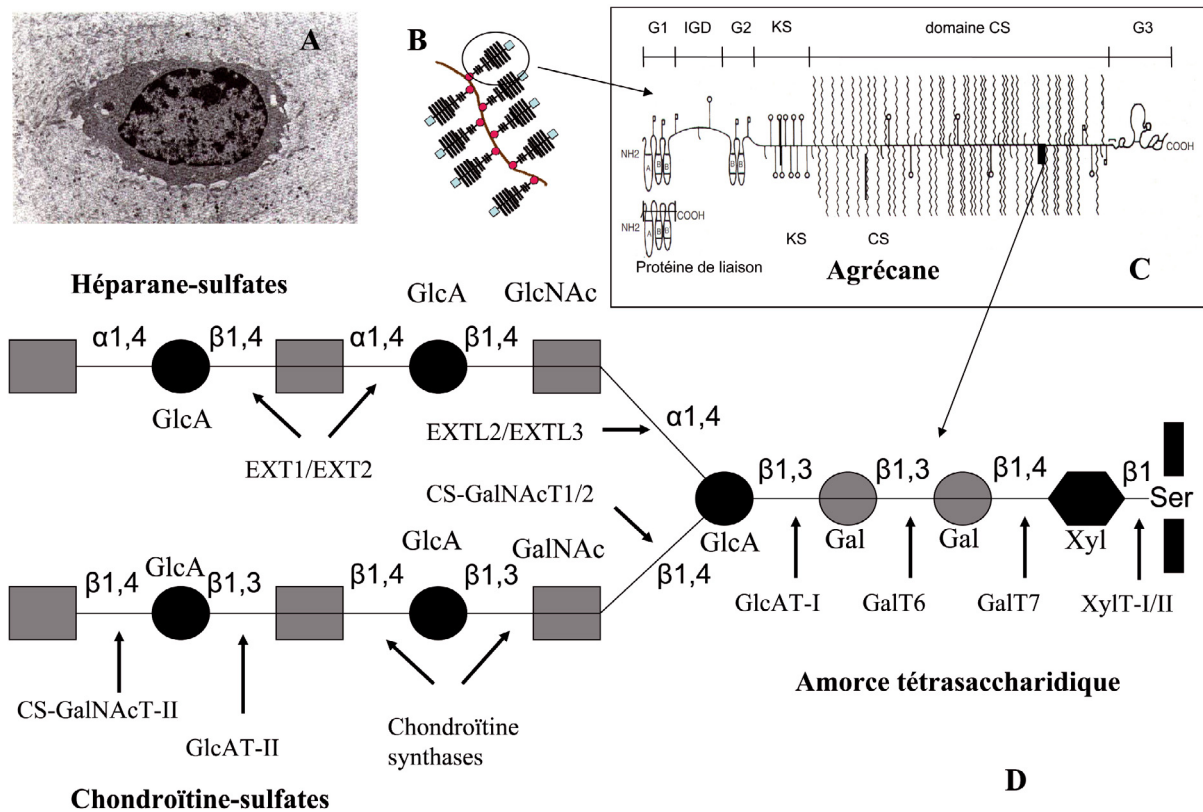
La fonctionnalité des articulations repose sur l'intégrité du cartilage qui est constitué de chondrocytes, cellules hautement différenciées, mais peu

abondantes au sein d'une matrice extracellulaire très riche en eau. Responsables de la biosynthèse des composants matriciels, les chondrocytes assurent également l'homéostasie du tissu par le renouvellement (anabolisme) et la dégradation (catabolisme) de ses constituants. Une modification de cet équilibre peut conduire à des altérations du cartilage, détérioration par excès de catabolisme (arthrose), ou au contraire, prolifération par excès d'anabolisme (ostéophytes, classiques « becs de perroquet »).

L'activité du chondrocyte est sous la dépendance de deux facteurs prépondérants : la tension en oxygène et la force exercée sur l'articulation. Le métabolisme du chondrocyte est adapté à une faible tension en oxygène (PO<sub>2</sub> 1-5 %). Ce tissu avasculaire reçoit les nutriments *via* le liquide synovial par imbibition. De plus, le cartilage articulaire est exposé à des compressions mécaniques intermittentes au cours d'exercices physiques ou tout simplement durant la marche. Cette pression hydrostatique qui favorise les interactions et les échanges entre le chondrocyte et les constituants matriciels joue un rôle majeur dans le maintien du phénotype cellulaire. Ainsi une immobilisation prolongée a un effet délétère sur le cartilage.

Les chondrocytes présentent un taux de renouvellement réduit, surtout à l'âge adulte, et sont responsables de la biosynthèse de macromolécules à demi-vie extrêmement longue, les collagènes et les protéoglycanes. De leurs interactions multiples en réseau tridimensionnel, découlent les propriétés physiques (biomécaniques) et biologiques (centre d'interaction de multiples facteurs) du tissu cartilagineux.

*Les collagènes.* Ce sont des macromolécules protéiques fibreuses composées chacune de 3 chaînes polypeptidiques (homotrimères ou hétérotrimères) riches en proline et hydroxyproline en arrangement régulier. Le cartilage contient les collagènes de type II, VI, IX, X et XI qui s'organisent de façon différente au sein de la matrice selon les trois zones distinctes



**Fig. 1.** L'agrécan et la matrice cartilagineuse. A, Chondrocyte humain entouré de la matrice cartilagineuse. B, Formation d'agrégats agrécan (cercle)-acide hyaluronique (oligosaccharide linéaire). C, L'agrécan, structure macromoléculaire. D, Structure chimique des glycosaminoglycans et nature des glycosyltransférases impliquées (voir texte).

caractérisant ce tissu (zones superficielle, de transition, profonde).

*Les protéoglycans (PG).* Ce sont des structures complexes composées d'une protéine porteuse sur laquelle est fixé de façon covalente un nombre variable d'oligosaccharides, les glycosaminoglycans (GAG). La matrice cartilagineuse articulaire contient essentiellement deux types de PG :

- Les PGs de petite taille faiblement représentés dans le cartilage et non spécifiques de ce tissu (moins de 3 %). Ils comprennent la décorine, le biglycane ou la fibromoduline. Ce sont des PGs riches en leucine, capables d'interagir avec des protéines matricielles comme le collagène de type II ou des facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ .
- L'agrécan qui est le PG majeur du cartilage (plus de 90 % des PG, 10 % du poids sec). Chaque monomère correspond à une macromolécule d'environ 2200 kDa, composée d'une protéine porteuse à laquelle sont attachés 2 types de GAG, les chondroïtines sulfates (CS), à raison d'une centaine par molécule du côté *C*-terminal et des kératane sulfates (KS) (une dizaine par molécule) à l'extrémité *N*-terminale (Fig. 1). L'agrécan

possède la propriété de se lier à l'acide hyaluronique pour former de larges agrégats de haut poids moléculaire (une centaine de monomères fixés à une molécule d'acide hyaluronique) *via* un domaine protéique globulaire (domaine G1) du côté *N*-terminal. Cette interaction est stabilisée par la présence d'une petite protéine de liaison. L'agrécan possède, en position *C*-terminale, un domaine G3 qui est perdu par coupure protéolytique au cours de la maturation de la molécule (Fig. 1). Il forme ainsi un réseau dense favorisant l'hydratation de la matrice cartilagineuse, tandis que les CS sont connus pour interagir plus particulièrement avec de nombreuses substances assurant l'homéostasie du cartilage (Dudhia, 2005).

#### L'arthrose et l'agrécan

L'arthrose représente une pathologie majeure du système musculosquelettique dont l'impact humain et socio-économique est considérable. Cependant, il n'existe pas actuellement de prise en charge glo-

bablement satisfaisante des lésions dégénératives du cartilage. La prescription de médicaments antalgiques et anti-inflammatoires, au prix parfois d'effets indésirables, soulage la symptomatologie sans enrayer significativement la progression de la maladie. Parmi les traitements non médicamenteux, la mise en place de prothèses est réservée aux formes évoluées de la maladie arthrosique. Les autres options incluent la rééducation, la prescription de substances réputées chondroprotectrices (glucosamine, CS, ...) et dans certains cas, l'ingénierie du cartilage (biomatériaux, greffes...). Ainsi, la conception et le développement de nouvelles thérapeutiques est un enjeu médical et économique de premier plan.

L'arthrose résulte d'une rupture de l'homéostasie chondrocytaire par des facteurs mécaniques, l'âge, le surpoids et des facteurs génétiques (Holderbaum *et al.*, 1999). Cette rupture d'homéostasie se fait au détriment des processus anaboliques à l'origine des constituants des macromolécules matricielles et conduit à une destruction du cartilage.

Au cours du processus arthrosique, on assiste précocement à une tentative de réparation du cartilage qui échoue, suivie d'une détérioration irréversible du cartilage et, à terme, de la perte de la fonction articulaire. Cette détérioration est liée à la fragmentation des agrécanes catalysée par l'activité protéolytique des agrécanases, surtout ADAMTS-4 et -5 qui clivent la protéine porteuse des GAG (Mosyak *et al.*, 2007). Parallèlement, on assiste à un raccourcissement des chaînes oligosaccharidiques des CS. Il s'ensuit donc une destruction progressive de ces macromolécules en fragments plus courts, entraînant irréversiblement l'altération des propriétés mécaniques et physiologiques du tissu. Si l'inhibition de facteurs cataboliques, incluant non seulement les ADAMTS, mais aussi les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) a été proposée pour stimuler la réparation du cartilage arthrosique, en s'opposant à sa dégradation, les résultats obtenus n'ont pas été concluants (Glasson, 2007). De façon complémentaire, l'utilisation de facteurs de croissance pour stimuler les voies métaboliques n'a pas non plus donné les effets bénéfiques escomptés (Fig. 2). Partant de ces observations, les glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des CS apparaissent comme des outils innovants pour stimuler la biosynthèse des GAG dans le cartilage arthrosique.

### Les glycosyltransférases : cibles pour le développement de nouvelles thérapeutiques

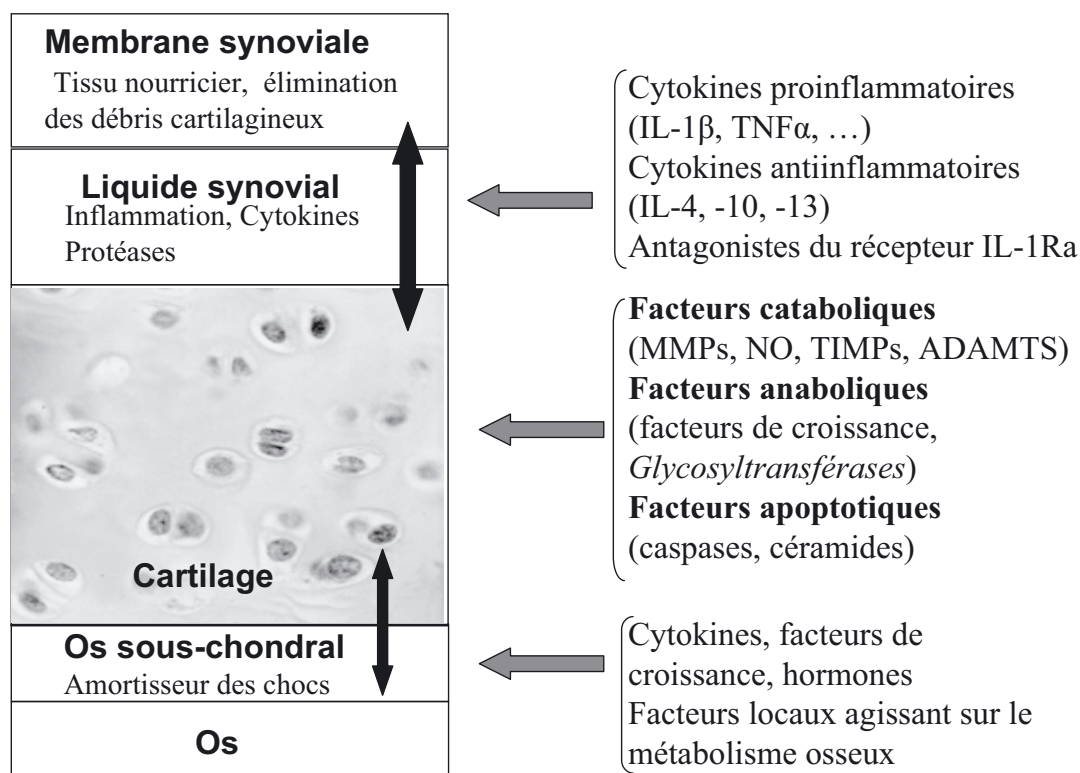
La biosynthèse des GAG fait intervenir de façon séquentielle et synchrone un grand nombre de glyco-

sylytransférases (Fig. 1). Elle nécessite au préalable la formation d'une amorce tétrasaccharidique (GlcA $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Xyl-O-Sérine) commune à l'ensemble des GAG. Cette amorce assure l'encrage de la chaîne glycosaminoglycanique à la protéine porteuse *via* un résidu sérine. La formation de cette amorce débute dans le réticulum endoplasmique et se termine dans le Golgi (Vertel *et al.*, 1993). Elle fait intervenir deux xylosyltransférases (Xyl-T-I/II) qui fixent un résidu xylose (Xyl) à partir du nucléotide UDP-Xyl, sur la sérine (Götting *et al.*, 2000). Ensuite, deux galactosyltransférases, la  $\beta$ 4galactosyltransférase 7 ( $\beta$ 4GalT-7) et la  $\beta$ 4galactosyltransférase 6 ( $\beta$ 4GalT-6), vont assurer la fixation de deux résidus galactoses (Gal) sur le Xyl (Almeida *et al.* 1999; Bai *et al.*, 2001). Enfin la galactose  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransférase-I (GlcAT-I) catalyse l'étape finale de la synthèse de l'amorce tétrasaccharidique par l'addition d'un acide glucuronique (GlcA) à partir de substrat donneur, l'acide UDP-glucuronique (UDP-GlcA) (Kitagawa *et al.*, 2001) (Fig. 1). À partir de cette amorce commune, la polymérisation des chaînes de GAG est effectuée par de nombreuses glycosyltransférases telles que EXT1 et EXT2 lors de la polymérisation des héparanes sulfates (HS) et par des chondroïtines sulfates synthases dans le cas des CS. C'est à ce niveau que s'effectue l'aiguillage vers la formation de CS ou de HS selon qu'un résidu *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) ou *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) est attaché à l'acide glucuronique terminal, respectivement. Les chaînes de CS sont modifiées par l'action conjuguée d'épimérasés et de sulfotransférases, ce qui contribue à augmenter la diversité et la fonctionnalité de ces macromolécules (Bayliss *et al.*, 1999). Des modifications de l'amorce tétrasaccharidique par sulfatation sur les Gal et phosphorylation sur le 2-OH du Xyl ont également été observées (Sugihara & Kitagawa, 2002). Bien que le rôle de ces substitutions ne soit pas compris précisément, il a été suggéré que la sulfatation et la phosphorylation pourraient constituer des signaux régulant la biosynthèse et la maturation des chaînes GAG.

Dans le but de maintenir ou rétablir l'homéostasie du cartilage en stimulant la biosynthèse de l'agrécane, nous avons considéré les glycosyltransférases catalysant la formation de l'amorce tétrasaccharidique comme cibles présentant un intérêt potentiel pour le développement de nouvelles thérapeutiques :

- dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, leur utilisation doit permettre de s'opposer à la dégénérescence du cartilage arthrosique, et stopper ou du moins limiter cette évolution irréversible. Dans un contexte lésionnel, la reconstruction d'un cartilage au moyen de nouveaux biomatériaux capables de restaurer ce tissu ap-

## Organisation de l'articulation      Cibles potentielles



**Fig. 2.** Les cibles thérapeutiques potentielles pour l'arthrose dans les différents tissus articulaires. Des thérapeutiques ont été développées à partir de certaines de ces cibles visant à réprimer/inhiber ou à surexprimer/activer des facteurs délétères ou favorables à la restauration du cartilage, respectivement. Ces approches sont restées sans succès jusqu'à présent. C'est dans ce contexte que nous proposons les glycosyltransférases comme cibles pour stimuler les fonctions anaboliques chondrocytaires. Les flèches indiquent les échanges existant entre la membrane synoviale, l'os sous-chondral et le cartilage.

paraît séduisante. Elle est basée sur l'association de cellules différenciées (chondrocytes) ou non (cellules-souches mésenchymateuses, natives ou modifiées par transfert de gène codant pour la glycosyltransférase d'intérêt) à des biomatériaux (systèmes associant ou non des polymères naturels comme le hyaluronate et des polymères polysaccharidiques) permettant de reproduire un environnement tridimensionnel adapté à la production d'un cartilage fonctionnel.

- dans le domaine du *drug-design*, leur caractérisation structurale, notamment la connaissance des bases moléculaires de la reconnaissance des substrats peut être à l'origine de la conception de substances glycomimétiques capables d'initier voire stimuler la biosynthèse des GAG. Une telle approche a été utilisée pour développer des substrats ou inhibiteurs de glycosyltransférases à visée anti-thrombotique, anti-amyloïde ou anti-proliférative (Sobue *et al.*, 1987; Martin *et al.*,

1996; Kolset *et al.* 1990; Kisilevsky *et al.*, 2004). De même, l'étude de la régulation de ces enzymes peut conduire au développement de substances pouvant moduler l'expression de la GlcAT-I, notamment susceptibles d'augmenter l'activité de l'enzyme et par là-même accélérer la production de GAG.

### Étude structurale et fonctionnelle de la GlcAT-I

Nous avons dans un premier temps identifié les glycosyltransférases catalysant la biosynthèse de l'amorce, dont l'expression et l'activité sont affectées par le processus arthrosique. La comparaison des taux des ARN messagers codant pour les 4 glycosyltransférases (XylT-I/II, GalT-6, GalT-7, GlcAT-I) au niveau des zones de cartilage humain saines et arthrosiques a montré une baisse de l'expression des XylT-I/II et GlcAT-I au niveau des lésions. Le niveau d'expression

des autres enzymes n'est pas significativement altéré. Cette répression s'accompagne d'une diminution du potentiel de synthèse des PG. Ces résultats indiquent que XylT-I/II et GlcAT-I qui catalysent respectivement la première et la dernière étape sont les plus sensibles à la pathologie arthrosique. Dans un deuxième temps, des expériences menées au laboratoire chez le rat ont montré que le l'IL-1 $\beta$ , médiateur de l'inflammation produit au cours de la pathologie arthrosique, est capable de réprimer l'expression de la GlcAT-I. Cette diminution d'activité conduit à une baisse importante de l'anabolisme des GAG dans le cartilage (Gouze *et al.*, 2001). Des résultats similaires sont obtenus lorsqu'une stratégie ARN anti-sens est mise en œuvre. Ces résultats qui soulignent le rôle fonctionnel important de l'enzyme dans la biosynthèse des GAG corroborent ceux montrant que l'enzyme constitue un facteur limitant de la biosynthèse des GAG dans des cellules CHO (Bai *et al.*, 1999). Nous avons effectivement montré que la GlcAT-I représente une cible pharmacologique intéressante pour le développement de stratégies réparatrices du cartilage (Venkatesan *et al.*, 2004, 2005). La surexpression de la GlcAT-I au moyen d'un système de transfert de gène non viral dans des chondrocytes ou des explants de cartilage provoque une augmentation significative de la biosynthèse et de l'accumulation des PG par stimulation de l'initiation des chaînes de CS. L'analyse qualitative des GAG néosynthétisés par la technique FACE (*Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis*, Calabro *et al.*, 2001) et par immunohistochimie au moyen d'anticorps monoclonaux dirigés contre les chondroïtines-4 et -6 sulfates a révélé que la composition et la taille des chaînes oligosaccharidiques sont comparables à celles retrouvées dans un cartilage normal. De plus, dans un modèle d'inflammation articulaire chez le rat provoquée par l'IL-1 $\beta$  et caractérisée par une diminution des PG, nous avons pu montrer que la GlcAT-I s'opposait complètement à l'action délétère de cette cytokine car elle était capable de restaurer les fonctions anaboliques chondrocytaires en termes de biosynthèse des CS. Cette étude démontre que des chondrocytes ou des explants de cartilage peuvent être transfectés par un gène non viral pour stimuler la synthèse des PG. Cette approche ouvre des perspectives prometteuses pour réparer les lésions cartilagineuses par transfection *ex-vivo* de la GlcAT-I dans les chondrocytes avant transplantation au niveau articulaire.

De façon complémentaire, nous avons entrepris une étude structurale et mécanistique de la GlcAT-I recombinante humaine par une approche d'ingénierie protéique combinant la mutagenèse dirigée, l'étude cinétique des mutants, la modélisation moléculaire et l'analyse phylogénétique. Nous avons déterminé les acides aminés régissant la spécificité de la GlcAT-I vis-à-vis du substrat donneur, l'acide UDP-glucuronique.

Une modélisation moléculaire du site actif à partir des éléments structuraux disponibles sur la structure 3-D de l'enzyme a permis de postuler l'implication des résidus His308 et Arg277 au niveau du site de fixation de l'acide glucuronique. Ces résidus, situés de part et d'autre du cycle glucuronique, prennent en sandwich le substrat donneur, ce qui explique la spécificité stricte de la GlcAT-I pour l'acide UDP-glucuronique. D'ailleurs la mutation de l'His308 en arginine élargit la spécificité de substrat de l'enzyme à d'autres UDP-hexoses (UDP-glucose, UDP-mannose, UDP-N-acétylglucosamine) qui sont acceptés par l'enzyme. Cette mutation démontre la possibilité de fabriquer des chaînes oligosaccharidiques synthétiques susceptibles d'être douées de propriétés pharmacologiques potentiellement intéressantes (Ouzzine *et al.*, 2002).

Des études complémentaires (Gulberti *et al.*, 2003; Fondeur-Gelinotte *et al.*, 2006, 2007) ont permis de mettre en évidence les acides aminés impliqués dans la fixation et le positionnement du substrat donneur et accepteur dans le site actif, ainsi que celui jouant le rôle de base catalytique dans la réaction enzymatique. De même, le mécanisme d'activation par le Mn<sup>++</sup> a été élucidé. Enfin l'importance de la modification structurale de l'amorce tétrasaccharidique au niveau des deux résidus Gal par sulfatation sur la régulation de l'activité de la GlcAT-I a été déterminée. Pour ce faire, une « chimiothèque » comportant un ensemble des motifs saccharidiques modifiés ou non a été établie (Jacquinet, 2006). Nous avons ainsi pu montrer que parmi les dérivés isomères de position sulfatés des Gal en positions C-4 et C-6, seul le dérivé sulfaté en C-6 du Gal 1 est substrat de la GlcAT-I. De façon intéressante, l'efficacité de l'enzyme est largement supérieure vis-à-vis du dérivé sulfaté, comparé à l'analogie non sulfaté. Cette étude démontre l'importance de ces modifications dans le contrôle de la spécificité des GT, un processus qui pourrait réguler la biosynthèse et la maturation des chaînes GAG (Gulberti *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données aboutit à une représentation détaillée du site actif enzymatique. Cette empreinte moléculaire doit servir de base à la conception par *docking* d'une bibliothèque de glycomimétiques susceptibles de stimuler la biosynthèse des GAG (Gulberti *et al.*, 2005).

#### Régulation de la GlcAT-I

La détermination des mécanismes responsables de la régulation de l'expression de la GlcAT-I, ainsi que des voies de signalisation impliquées, offre la possibilité de moduler la quantité de la protéine, notamment de surexprimer cette enzyme pour accélérer la biosynthèse des GAG. Le clonage du promoteur de la GlcAT-I humaine par la technique de marche sur

le chromosome a été réalisé au laboratoire. L'analyse de l'importance des différentes régions 5' non codantes dans l'activité du promoteur déterminée en utilisant la luciférase comme gène rapporteur montre que l'expression de la GlcAT-I est régulée par le calcium. Cette régulation s'effectue *via* une voie de signalisation calcium dépendante impliquant l'intervention de sp1, ERK et p42/p44 MAPK (Barré *et al.*, 2006). Elle permet d'apporter une possible explication au rôle stimulant du calcium intracellulaire dans la biosynthèse des PG (Lenz *et al.*, 1982; Vijayagopal & Bhubramaniam, 2001) et relance l'implication des hormones calciotropes comme l'hormone parathyroïdienne, la vitamine D, ainsi que celle de protéines impliquées dans le remodelage osseux, comme la calcitonine et l'ostéocalcine dans l'étiologie de l'arthrose.

## Conclusions et perspectives

La découverte et la caractérisation de protéines-clés du processus arthrosique ouvrent des perspectives prometteuses pour le développement de nouvelles thérapeutiques. Ce travail s'est focalisé dans un premier temps sur l'étude de la GlcAT-I. L'importance de cette enzyme dans la biosynthèse des CS, plus particulièrement ses capacités à contrecarrer complètement la destruction des protéoglycanes initiée par l'IL-1 $\beta$  en font une protéine de choix pour envisager la restauration de la matrice cartilagineuse par thérapie cellulaire ou génique. La mise en œuvre de techniques efficaces de transfert de gènes au travers de la matrice cartilagineuse, notamment par électroporation (Grossin *et al.*, 2006) et la construction de vecteurs non viraux performants sont un gage de faisabilité et de succès. Les Xyl-I/II qui catalysent la première étape de la construction de l'amorce, et dont l'expression semble affectée par la pathologie, sont également des protéines prometteuses à considérer dans ce contexte. Enfin l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses capables de conduire au phénotype chondrocytaire ouvre des perspectives nouvelles pour la réparation du cartilage articulaire.

## Remerciements

L'aide apportée par la Région Lorraine, le Conseil Général de Meurthe-et-Moselle, et par la Communauté Urbaine du Grand Nancy est très appréciée.

## Références

- Almeida R., Levery S. B., Mandel U., Kresse H., Schwientek T., Bennett E. P. & Clausen H. Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose :beta-xylose  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human  $\beta$ 4-galactosyltransferase gene family. *J Biol Chem*, 1999, 274, 26165–26171.
- Bai X., Zhou D., Brown J. R., Crawford B. E., Hennes T. & Esko J. D. Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans : cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase family ( $\beta$ 3GalT6). *J Biol Chem*, 2001, 276, 48189–48195.
- Barré L., Venkatesan N., Magdalou J., Netter P., Fournel-Gigleux S. & Ouzzine M. Evidence of calcium dependent pathway in the regulation of human  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferase-1 (GlcAT-I) gene expression: a key enzyme in proteoglycan synthesis. *FASEB J*, 2006, 20, 963–975.
- Bayliss M.T., Osborne D., Woodhouse S. & Davidson C. Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. Effet of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. *J Biol Chem*, 1999, 274, 15892–15900.
- Calabro A., Midura R., Wang A., West L., Plaas A. & Hascall V. C. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of glycosaminoglycans. *Osteoarthritis & Cartilage*, 2001, 9, 16–22.
- Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62, 2241–2256.
- Fondeur-Gelinotte M., Lattard V., Oriol R., Mollicone J.-C., Jacquinet J.-C., Mulliert G., Gulberti S., Netter P., Magdalou J., Ouzzine M. & Fournel-Gigleux S. Phylogenetic and mutational analyses reveal key residues for UDP-glucuronic acid binding and activity of  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I). *Protein Sci*, 2006, 15, 1667–1678.
- Fondeur-Gelinotte M., Lattard V., Gulberti S., Oriol R., Mulliert G., Coughtrie M. W., Magdalou J., Netter P., Ouzzine M. & Fournel-Gigleux S. Molecular basis for acceptor substrate specificity of the human  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferases GlcAT-I and GlcAT-P involved in glycosaminoglycan and HNK-1 carbohydrate epitope biosynthesis, respectively. *Glycobiology*, 2007, 17, 857–867.
- Glasson S. S. In vitro osteoarthritis validation utilizing genetically-modified mice. *Curr Drug Target*, 2007, 8, 367–376.
- Götting C., Kuhn J., Zahn R., Brinkmann T. & Kleesiek K. Molecular cloning and expression of human UDP-D-xylose : proteoglycan core protein  $\beta$ -D-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J Mol Biol*, 2000, 304, 517–528.
- Gouze J.-N., Bordji K., Gulberti S., Terlain B., Netter P., Magdalou J., Fournel-Gigleux S. & Ouzzine M. Interleukin 1 $\beta$  down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis : influence of glucosamine on interleukin 1 $\beta$ -mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2001, 44, 351–360.
- Grossin L., Cournil-Henrionnet C., Pinzano A., Gaborit N., Dumas D., Etienne S., Stoltz J.-F., Terlain B., Netter P., Mir L. M. & Gillet P. Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection *in*

- in vitro* and during experimental osteoarthritis. *FASEB J*, 2006, 20, 65–75.
- Gulberti S., Fournel-Gigleux S., Mulliert G., Aubry A., Netter P., Magdalou J. & Ouzzine M. The functional glycosyltransferase signature sequence of the human  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferase is a XDD motif. *J Biol Chem*, 2003, 278, 32219–32226.
- Gulberti S., Lattard V., Fondeur M., Jacquinet J.-C., Mulliert G., Netter P., Magdalou J., Ouzzine M. & Fournel-Gigleux S. Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and  $\beta$ 1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J Biol Chem*, 2005, 280, 1417–1425.
- Holderbaum D., Haqqi T. M. & Moskowitz R. W. Genetics and osteoarthritis: exposing the iceberg. *Arthritis Rheum*, 1999, 42, 397–405.
- Jacquinet J.-C. Synthesis of a set of sulfated and/or phosphorylated oligosaccharide derivatives from the carbohydrate-protein linkage region of proteoglycans. *Carbohydr Res*, 2006, 341, 1630–1644.
- Kisilevsky R., Szareck W. A., Ancsin J. B., Elimova E., Marone S., Bhat S. & Berkin A. Inhibition of amyloid A amyloidogenesis *in vitro* in tissue culture by 4-deoxy analogues of peracetylated 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucose: implications for the treatment of various amyloidoses. *Am J Pathol*, 2004, 164, 2127–2137.
- Kitagawa H., Taoka M., Tone Y., & Sugahara K. Human glycosaminoglycan glucuronyltransferase I gene and a related processed pseudogene: genomic structure, chromosomal mapping and characterization. *Biochem J*, 2001, 358, 539–546.
- Kolset S. O., Sakurai K., Ivhed I., Overvatn A. & Suzuki S. The effect of  $\beta$ -D-xylosides on the proliferation and proteoglycan biosynthesis of monoblastic U-937 cells. *Biochem J*, 1990, 265, 637–645.
- Lenz R. W., Ax R. I. & First N. L. Proteoglycan production by bovine granula cells *in vitro* is regulated by calmodulin and calcium. *Endocrinology*, 1982, 110, 1052–1054.
- Martin N. B., Masson P., Sepulchre C., Theveniaux J., Millet & Bellamy F. Pharmacologic and biochemical profiles of new venous antithrombotic  $\beta$ -D-xylosides derivatives: potential antiathero/thrombotic drugs. *Semin Thromb Hemost*, 1996, 22, 247–254.
- Mosyak L., Georgiadis K., Shane T., Svenson K., Hebert T., McDonagh T., Mackie S., Olland S., Lin L., Zhong X., Kriz R., Reifenberg E. L., Collins-Racie L. A., Corcoran C., Freeman B., Zollner R., Marvell T., Vera M., Sum P.-E., Lavallie E. R., Stahn M. & Somers W. Crystal structure of the two major aggrecan degrading enzymes, ADMTS4 and ADAMTS5. *Protein Sci*, 2007, 17, 16–21.
- Ouzzine M., Gulberti S., Levoine N., Netter P., Magdalou J. & Fournel-Gigleux S. The donor substrate specificity of the human  $\beta$  1,3-glucuronosyltransferase I toward UDP-glucuronic acid is determined by two crucial histidine and arginine residues. *J Biol Chem*, 2002, 277, 25439–25445.
- Sobue M., Habuchi H., Ito K., Yonekura H., Oguri K., Sakurai K., Kamohara S. Ueno Y., Noyori R. & Suzuki S.  $\beta$ -D-xylosides and their analogues as artificial initiators of glycosaminoglycan chain synthesis. Aglycone-related variation in their effectiveness *in vitro* and *in ovo*. *Biochem J*, 1987, 241, 591–601.
- Sugahara K. & Kitagawa H. Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *I U B M B Life*, 2002, 54, 163–175.
- Venkatesan N., Barré L., Benani A., Netter P., Magdalou J., Fournel-Gigleux S. & Ouzzine M. Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery: a novel strategy to promote cartilage repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 18087–18092.
- Venkatesan N., Magdalou J., Netter P., Fournel-Gigleux S. & Ouzzine M. Stimulation de la biosynthèse des protéoglycanes : une nouvelle stratégie pour la réparation du cartilage articulaire. *Médecine/Sciences*, 2005, 21, 471–473.
- Vertel B. M., Walters L. M., Flay N., Kearns A. E. & Schwartz N. B. Xylosylation is an endoplasmic reticulum to Golgi event. *J Biol Chem*, 1993, 268, 11105–11112.
- Vijayagopal P. & Bubramaniam P. Effect of calcium channel blockers on proteoglycan synthesis by vascular smooth muscle cells and low density lipoprotein-proteoglycan interactions. *Atherosclerosis*, 2001, 157, 353–360.