



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITE HENRI POINCARE
2009**

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT

THESE

Présentée et soutenue publiquement
Le 20 novembre 2009

Pour obtenir le titre de
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARE – NANCY I**

Mention Sciences de la Vie et de la Santé

Par
Catherine Bui

Titulaire de Diplôme d'Etudes Approfondies
Métabolisme et Mécanismes d'Action des Médicaments – Pharmacologie Clinique

Sujet :
**Exploration des enzymes de biosynthèse des protéoglycanes et leurs
altérations lors de pathologies articulaires**

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs : Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart, Reims
Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski (DR INSERM), Lille

Juges : Monsieur le Professeur Michael WH Coughtrie, Dundee (ECOSSE)
Madame le Docteur Sylvie Fournel-Gigleux (DR INSERM), Vandoeuvre-lès-Nancy
Monsieur le Docteur Jean-Claude Jacquinet (DR INSERM), Orléans
Monsieur le Docteur Mohamed Ouzzine (DR INSERM), Vandoeuvre-lès-Nancy
Monsieur le Professeur Kristian Prydz, Oslo (NORVEGE)

Membre invité : Monsieur le Docteur Jacques Magdalou (DR CNRS), Vandoeuvre-lès-Nancy

Ce travail a été réalisé au sein du
Laboratoire de Pharmacologie, Physiopathologie et Ingénierie Articulaires
UMR 7561 - Université Henri Poincaré - Nancy I
(Directeur : Dr. Jacques Magdalou ; Directeur adjoint : Pr. Patrick Netter)
Equipe Pharmacologie Moléculaire, Structure-Fonction
Responsables : Dr. Sylvie Fournel-Gigleux ; Dr. Mohamed Ouzzine

Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), de la Région Lorraine, de la Communauté Urbaine du Grand Nancy, du Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie, de l'Université Henri-Poincaré, du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et de la bourse « Stevenson Exchange » de l'Egide.

Il a bénéficié d'un financement de l'Agence Nationale pour la Recherche (GAG-Network ANR-08-PCVI-0023-01), de la Ligue Régionale contre le Cancer, et a été réalisé dans le cadre d'un contrat de collaboration international C2I et d'un « Royal Society International Joint Grant » avec l'Université de Dundee.

Remerciements

A Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart pour avoir accepté la charge de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude et de l'expression de mes remerciements les plus respectueux.

A Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski pour avoir également accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur. Qu'il trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Michael WH Coughtrie pour nous faire l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examineur et de m'avoir accueillie aussi chaleureusement au sein de son laboratoire et son équipe à Dundee. Je le remercie sincèrement pour cette collaboration enrichissante et cette belle expérience en Ecosse.

A Monsieur le Professeur Kristian Prydz pour avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse et de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire à Oslo et de m'avoir enseigné les techniques de purification et d'analyse des protéoglycanes indispensables à cette thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude et l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Jean-Claude Jacquet d'avoir la gentillesse d'accepter d'être membre de ce jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Mohamed Ouzzine pour avoir accepté de faire partie de ce jury, de sa disponibilité et de ses précieux conseils en particulier pour venir à bout de gènes les plus récalcitrants qui auront marqué cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression des mes plus vifs remerciements pour l'intérêt constant porté à mon travail.

A Monsieur le Docteur Jacques Magdalou de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Qu'il accepte ici mes plus vifs remerciements pour sa disponibilité, sa gentillesse et la qualité de ses conseils. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Patrick Netter, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A Madame le Docteur Sylvie Fournel-Gigleux pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et son implication constante dans ce travail de thèse. Je lui adresse ici toute ma reconnaissance pour m'avoir soutenue et pour avoir fait preuve de ténacité durant les moments les plus difficiles. Je tiens également à la remercier pour les bons moments passés en Ecosse avec Victor et Michel. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde sympathie et de mes sincères remerciements.

Merci à Lydia et Sandrine pour leur soutien, leur bonne humeur et leurs conseils durant ces années de thèse et à tous les membres du laboratoire de l'UMR.

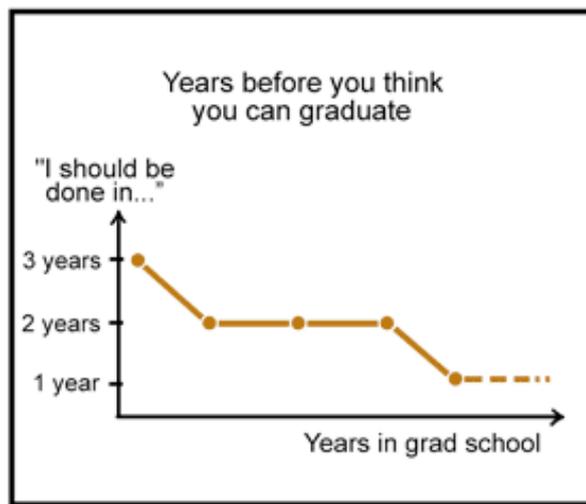
Merci à tous les membres des équipes à Dundee et Oslo où j'ai passé d'agréables moments en leur compagnie. Je leur adresse mes remerciements pour leur accueil, leur bonne humeur et leur précieuse aide lors de mes séjours.

Merci à mes « compagnons » de thèse, Ibtissam et Dong pour m'avoir accompagnée tout au long de ces années, merci pour votre sympathie et votre soutien au quotidien. Je remercie particulièrement Ibtissam pour le travail de purification de la GST- β 4GalT7 et sa forte contribution pour les études fonctionnelle et structurale menées au cours de cette thèse. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amitié.

Merci à mes amies Kaother, Marie et Sandrine D. pour leur présence et leurs encouragements tout au long de ces années d'étude. Je les remercie et leur témoigne ici ma profonde amitié.

Cảm ơn đên cha mẹ tôi, và gia đình tôi đã tin vào tôi, theo con đường của tôi mỗi ngày và được sự hỗ trợ cần thiết trong thời điểm khó khăn. Tôi gửi tất cả tình yêu của tôi.

Merci à Valentin pour avoir toujours cru en moi, accompagné et apporté le réconfort nécessaire durant toutes ces années de thèse. Je le remercie d'avoir fait preuve d'écoute et de compréhension. Je tiens à lui adresser par ces quelques mots toute mon affection et ma reconnaissance.



JORGE CHAM © 2008

WWW.PHDCOMICS.COM

*A Valentin,
A mes parents,
A ma famille et ma belle-famille,
A mes amis*

Sommaire	1
Liste des illustrations	8
Liste des abréviations	10
Introduction bibliographique	12
PARTIE 1 : LES PROTEOGLYCANES ET LES GLYCOSAMINOGLYCANES	
<u>I. Structure et classification des protéoglycanes</u>	12
I.1 Les protéoglycanes	12
I.2 Les chaînes de glycosaminoglycane	13
<u>II. Les protéoglycanes, composants essentiels des matrices extracellulaires</u>	15
II.1 La famille des agrécane	16
II.1.1 Structure et fonction de l'agrécane	16
II.1.2 Pathologies liées à un déficit en agrécane	18
II.2 Les « <i>small rich leucine proteoglycans</i> » ou SRLPs	18
II.2.1 La décorine	19
Propriétés structurales et fonctionnelles de la décorine	19
Pathologies liées à un déficit en décorine	20
II.2.2 Le biglycan	21
Pathologies liées à un déficit en biglycan	21
II.2.3 La fibromoduline et le lumican	22
Pathologies associées à un déficit de fibromoduline ou de lumican	22
<u>III. Les protéoglycanes membranaires</u>	22
III.1 La famille des syndécans	24
III.1.1 Structure des syndécans	24
III.1.2 Fonctions biologiques	25
III.1.3 Exemple du syndécane-1 et implication dans le myélome multiple des os	26
III.2 Les glypicans	27
III.2.1 Structure des glypicans	27
III.2.2 Fonctions biologiques	28
III.2.3 Exemple du glypican-3 et implication pathologique dans le syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGB)	29
III.3 Implication des protéoglycanes à héparane-sulfates dans le processus cancéreux	29
<u>IV. Perspectives thérapeutiques basées sur les multiples propriétés des protéoglycanes</u>	32
IV.1 Les chondroïtine-sulfates et la glucosamine	32

IV.2 Les xylosides	33
IV.3 L'héparine et ses dérivés	34
PARTIE 2 : LES VOIES DE BIOSYNTHESE ET DE MODIFICATION DES PROTEOGLYCANES	36
<u>I. Les voies de biosynthèse des glycosaminoglycanes</u>	36
I.1 Synthèse de l'amorce tétrasaccharidique	36
I.1.2 La famille des β 1,4galactosyltransférases	38
I.1.2.1 Caractéristiques fonctionnelles	38
I.1.2.2 La β 1,4-galactosyltransférase 7 (β 4GalT7, EC 2.4.1.133)	40
Caractéristiques enzymatiques	40
Caractéristiques moléculaires	42
I.1.2.3 La β 1,4-galactosyltransférase 1 bovine	43
I.2 Elongation des chaînes de glycosaminoglycanes	44
I.2.1 Synthèse des chaînes de galactosaminoglycanes	44
I.2.2 Synthèse des chaînes de glucosaminoglycanes	44
Les exostosines 1 et 2 (EXT1/EXT2)	45
<u>II Les réactions de modification de l'amorce et des unités disaccharidiques</u>	46
II.1 Modifications de l'amorce	47
Phosphorylation en C2 du xylose de l'amorce	47
Sulfatation des résidus galactose au niveau de l'amorce	47
II.2 Modifications des unités disaccharidiques	48
II.2.1 Epimérisation des acides uroniques	48
II.2.2 Sulfatation des résidus composant les chaînes de glycosaminoglycane	49
Sulfatation de l'héparine et des héparane-sulfates	49
Sulfatation des chondroïtine-sulfates et dermatane-sulfates	49
N-glycosylations	50
II.3 La famille des sulfotransférases à héparane-sulfates	50
II.3.1 Généralités	51
La réaction de sulfatation	51
Topologie des sulfotransférases	51
N-sulfatation des héparane-sulfates	51
O-sulfatation des héparane-sulfates	52

II.3.2 Spécificité de substrat des enzymes et des interactions protéine-ligand des héparane-sulfates	53
Exemple du site pentaosidique de fixation de l'héparine à l'antithrombine III	54
Exemple de la glycoprotéine D du virus de l'herpès	55
La 3-O-sulfatation	56
<u>III. Implication des enzymes participant aux voies de biosynthèse et de dégradation des protéoglycanes dans des situations pathologiques</u>	57
III.1 Expression et déficience génétique de la β 1,4-galactosyltransférase 7	58
III.2 Les EXT1/EXT2 et implication dans la maladie des exostoses multiples et la cancérogenèse	59
III.3 Les enzymes de modification ou de dégradation impliquées dans la cancérogenèse	60
L'héparanase	60
Les sulfotransférases	60
Les sulfatases	61

PARTIE 3 : REGULATION DES VOIES DE BIOSYNTHESE DES PROTEOGLYCANES

<u>I. Régulation de l'initiation de la biosynthèse des chaînes de glycosaminoglycane au niveau de la protéine « core »</u>	62
I.1 Xylosylation et site d'attachement de la chaîne de glycosaminoglycane	62
I.2 Rôle de la composition de la structure primaire de la protéine « core » dans l'orientation des voies de biosynthèse des protéoglycanes	63
I.3 Phosphorylation en C2 du xylose et sulfatation des résidus galactose de l'amorce	64
I.4 β -D-xyloside et polymérisation des chaînes de glycosaminoglycane	67
I.5 Polymorphisme des xylosyltransférases	67
<u>II. Variations de la longueur des chaînes de glycosaminoglycane</u>	68
II.1 Effet de l'expression des enzymes EXTs sur la longueur d'élongation des chaînes d'héparane-sulfates	68
II.2 Sulfatation et transporteurs de PAPS	69
<u>III. Les mécanismes épigénétiques</u>	70
III.1 Définition et mécanismes	71
III.1.1 Réaction	72
III.1.2 Modification des histones et méthylation de l'ADN	73
III.2 Epigénétisme et pathologies	73
III.3 Epigénétisme et thérapie, diagnostic et pronostic	74

Présentation de l'étude	77
Matériels et méthodes	81
Matériels	81
<u>I. Lignées cellulaires et réactifs de culture cellulaire</u>	81
<u>II. Réactifs de biologie moléculaire</u>	81
<u>III. Réactifs radiomarqués</u>	82
<u>IV. Réactifs biochimiques</u>	82
Méthodes expérimentales	82
<u>I. Systèmes d'expression hétérologue dans les cellules eucaryotes</u>	82
I.1 Construction des plasmides	83
Le vecteur d'expression codant la β 4GalT7 recombinante humaine	83
Le vecteur d'expression codant la décorine recombinante humaine	83
Le vecteur d'expression codant les sulfotransférases recombinantes humaines 3-OST1 et 3-OST3A	84
I.2 Mutagenèse dirigée et production des mutants de la β 4GalT7 recombinante humaine	84
I.3 Transfection transitoire des cellules eucaryotes par le plasmide codant la β 4GalT7 recombinante humaine et les mutants	85
I.4 Transfection transitoire des cellules HEMC par le plasmide codant les sulfotransférases 3-OST1 et 3-OST3A	86
I.5 Traitement des cellules MCF7 avec le facteur de croissance FGF-7	87
<u>II. Tests cellulaires</u>	87
II.1 Prolifération cellulaire	87
II.2 Test d'adhésion cellulaire	87
II.3 Test de cicatrisation et d'invasion cellulaire ou « wound healing »	88
II.4 Test de migration cellulaire en chambre de Boyden	89
<u>III. Préparation et analyse des protéines recombinantes exprimées dans les cellules eucaryotes</u>	89
III.1 Analyse de l'expression des protéines recombinantes par immunoblot	89
III.2 Evaluation de l'activité GalT et détermination des constantes cinétiques apparentes par chromatographie haute performance	90
Exploitation des données	91

<u>IV. Etudes des profils de méthylation des gènes impliqués dans la biosynthèse des protéoglycanes à héparane-sulfates et analyses qualitative et quantitative des protéoglycanes à héparane-sulfates produits</u>	92
IV.1 Etablissement des cartes de méthylations des gènes codant les GTs et les STs	92
Extraction de l'ADN génomique cellulaire	92
Conversion au bisulfite	92
Nested-PCR	92
IV.2 Analyse du taux d'expression des ARN messagers après traitement à la 5-Aza-dc	93
Traitement des cellules à la 5-Aza-dc	93
Extraction des ARN totaux des cellules et analyses en RT-PCR semi-quantitative	93
<u>V. Analyses qualitatives et quantitatives des protéoglycanes matriciels et excrétés</u>	93
IV.1 Analyse en immunofluorescence des héparane-sulfates cellulaires	93
IV.2 Analyses qualitatives et quantitatives des protéoglycanes après radiomarquage	94
IV.2.1 Mesure du taux de biosynthèse des protéoglycanes par incorporation de soufre 35	94
Radiomarquage des cellules	94
Extraction et purification des protéoglycanes cellulaires par précipitation au chlorure de cétypyridinium	94
IV.2.2 Isolation et analyses qualitative et quantitative des macromolécules radiomarquées	95
Radiomarquage des cellules	95
Dessalage des milieux de culture et lysats cellulaires	95
Digestion spécifique par des endoglycosidases	95
IV.2.2.1 Analyse des protéoglycanes par SDS-PAGE en gel de polyacrylamide à gradient (4-12% Bis-Tris)	95
IV.2.2.2 Chromatographie échangeuse d'anions	95
IV.2.2.3 Chromatographie d'exclusion stérique	95
Résultats	
Publication n°1	
<u>I. Exploration des mécanismes de régulation des voies de biosynthèse des protéoglycanes</u>	97

I.1 Etablissement de la cartographie de méthylation des gènes codant les glycosyltransférases et les sulfotransférases impliquées dans la synthèse des chaînes d'héparane-sulfates dans les cellules de chondrosarcome humain HEMC	97
I.2 Analyse semi-quantitative de l'expression des ARNm codés par les gènes d'intérêt après traitement à la 5-Aza-dc	98
I.3 Analyses qualitatives et quantitatives des protéoglycanes cellulaires après traitement à la 5-Aza-dc	99
I.3.1 Analyse du contenu en protéoglycanes de chondrocytes et de cellules HEMC par SDS-PAGE	100
I.3.2 Analyse des protéoglycanes cellulaires par chromatographie échangeuse d'anions et chromatographie d'exclusion stérique	102
I.4 Analyse des protéoglycanes après transfection transitoire par les plasmides pcDNA-3OST1HA ou pcDNA-3OST3AHA par chromatographie échangeuse d'anions	103
I.5 Analyse en immunofluorescence des cellules traitées à la 5-Aza-dc et transfectées par les plasmides pcDNA-3OST1HA ou pcDNA-3OST3AHA	105
I.6 Conséquences fonctionnelles du traitement 5-Aza-dc ou de la surexpression des 3-OST1 ou 3-OST3A dans les cellules HEMC	105
I.7 Etablissement des cartes de méthylation des glycosyltransférases et 3-OSTs dans les cellules de chondrosarcome humain SW 1353	109

Publication n°2

<u>II. Exploration du rôle des 3-OSTs sur la prolifération cellulaire dans une lignée cellulaire d'adénocarcinome du sein MCF7</u>	112
II.1 Cartographie de méthylation des gènes 3-OST dans les cellules MCF7	112
II.2 Analyse des protéoglycanes cellulaires et excrétés des cellules MCF7	113
II.3 Conséquences fonctionnelles de la surexpression des gènes 3-OST1 et 3-OST3A dans les cellules MCF7	113
II.3.1 Etude de l'activation de la voie des MAPK médiée par les chaînes de HS cellulaires	114
II.3.2 Conséquences fonctionnelles de la surexpression des 3-OST1 et 3-OST3A sur la prolifération cellulaire	115

Publication n°3

<u>III. Etudes fonctionnelles et structurales de la β4GalT7 recombinante humaine : rôle des motifs D¹⁶³VD¹⁶⁵ et F²²¹WGWGREDD²³⁰ dans la liaison du substrat donneur UDP-Gal et du cofacteur métallique</u>	116
III.1 Analyse phylogénétique de la famille des β 4GalTs et identification des acides aminés conservés au sein des β 4GalTs	116
III.2 Mesure des activités <i>in vitro</i> de la β 4GalT7 sauvage et des mutants après expression dans un système d'expression hétérologue eucaryote	117
III.3 Caractérisation <i>ex vivo</i> des propriétés fonctionnelles de l'enzyme sauvage et des mutants	119
III.4 Effets <i>ex vivo</i> de l'introduction de mutants β 4GalT7 dans l'initiation de la biosynthèse des GAGs à partir de la protéine « core » de la décorine ou de xyloside exogène	121
Discussion	123
Conclusions et perspectives	133
Références bibliographiques	136

Liste des illustrations

Figures

- Figure 1 (page 14): Représentation schématique des unités disaccharidiques élémentaires des différents GAGs
- Figure 2 (page 16): Représentation schématique de la matrice extracellulaire du cartilage
- Figure 3 (page 17): Représentation schématique de l'agrécan
- Figure 4 (page 20): Représentation schématique de la décorine
- Figure 5 (page 23): Fonctions des PGs à HS au sein des cellules
- Figure 6 (page 25): Représentation schématique de la famille des syndécans
- Figure 7 (page 26): Exemple de trois fonctions exercées par les PGs à HS membranaires dans la cellule
- Figure 8 (page 28): Représentation schématique des glypicans
- Figure 9 (page 31): Rôle des chaînes de HS dans la progression métastatique
- Figure 10 (page 37): Assemblage de l'amorce tétrasaccharidique des chaînes de GAG et extension vers les voies de biosynthèse des Hep/HS ou CS/DS
- Figure 11 (page 41): Réaction catalysée par la β 4GalT7
- Figure 12 (page 42): Schéma des domaines conservés de la famille des β 4GalTs
- Figure 13 (page 44): Structure cristallographique de la β 4GalT1 bovine avec le substrat accepteur (β -D-glucopyranose) lié dans le site actif
- Figure 14 (page 45): Extension de l'amorce tétrasaccharidique vers la voie des Hep/HS catalysée par des polymérases EXTL3 et EXT1/EXT2
- Figure 15 (page 50): Modifications des chaînes de HS et CS
- Figure 16 (page 55): Exemples de deux domaines de fixation sur les chaînes de HS
- Figure 17 (page 72): Exemples de deux mécanismes épigénétiques : la méthylation de l'ADN et les modifications des histones
- Figure 18 (page 92): Schéma de conversion chimique au bisulfite des cytosines
- Figure 19 (page 101): Gel SDS-PAGE des PGs cellulaires et excrétés de cellules de chondrocytes
- Figure 20 (page 104): Gel SDS-PAGE des PGs cellulaires et excrétés de cellules HEMC

- Figure 21 (page 104): Chromatogramme des PGs à HS cellulaires après surexpression des 3-OST1 et 3-OST3A dans les cellules HEMC
- Figure 22 (page 107): Cinétique de prolifération et de migration des cellules HEMC et d'une lignée de cellules HEMC surexprimant de manière stable la 3-OST1
- Figure 23 (pages 110-111): Profils de méthylation des GTs et des STs impliquées dans les voies de biosynthèse et de modification des PGs à HS dans les cellules SW 1353
- Figure 24 (page 113): Gel SDS-PAGE des PGs cellulaires et excrétés de cellules MCF7
- Figure 25 (page 115): Analyse par immunoblot des protéines p44/42 (MAPK) et Phospho-p44/42 (MAPK) dans les cellules MCF7

Tableaux

- Tableau 1 (page 32): Pathologies associées à une déficience ou surexpression d'un PG
- Tableau 2 (page 40): Caractéristiques fonctionnelles des β 4GalTs
- Tableau 3 (page 54): Exemples d'interaction entre les PGs à HS et différents ligands protéiques
- Tableau 4 (page 57): Spécificité de substrat et activité biologique médiée par des isoformes de 3-OST
- Tableau 5 (page 58): Pathologies d'origine génétique associées à une déficience en GT ou à un transporteur de PAPS
- Tableau 6 (page 66): Modifications des résidus osidiques de l'amorce et des chaînes de GAG et conséquences sur la voie de biosynthèse des GAGs
- Tableau 7 (page 83): Description des amorces utilisées pour le clonage de la β 4GalT7
- Tableau 8 (page 84): Description des amorces utilisées pour le clonage de la décorine
- Tableau 9 (page 84): Liste des amorces utilisées pour le clonage des 3-OST1 et 3-OST3A
- Tableau 10 (page 85): Description des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée
- Tableau 11 (page 108): Quantification du pourcentage des aires non occupées par les cellules HEMC

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASB	Albumine de Sérum Bovine
5-Aza-dc	5-aza-2'-déoxycytidine
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CPC	Chlorure de cétylpyridinium
CpG	Cytidine phosphodiester Guanosine
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
DEAE	Diéthylaminoéthyl
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNMT	DNA méthyltransferase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Syndrome d'Ehlers-Danlos
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EXT1	Exostoses 1
FACE	<i>Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FGFR	Récepteur au FGF
GAG	Glycosaminoglycane
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -acétylgalactosamine
β3GalT6	β1,3-galactosyltransférase 6
β4GalT1	β1,4-galactosyltransférase 1 bovine
β4GalT7	β1,4-galactosyltransférase 7
GlcA	Acide glucuronique
GlcAT-I	β1,3-glucuronosyltransférase I
GlcN ou GlcNH ₂	Glucosamine
GlcNS	<i>N</i> -sulfo-D-glucosamine
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferase
GT	Glycosyltransférase
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
HA	Acide Hyaluronique
HDAC	Histone Déacétylase
HEPES	Tris [hydroxyméthyl]aminométhane, acide <i>N</i> -(2-hydroxyéthyl)pipérazine - <i>N'</i> -(2-éthane) sulfonique
HMT	Histone Méthyltransferase
HME	<i>Hereditary Multiple Exostoses</i>
IGF-2	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
HBPM	Héparine de Bas Poids Moléculaire
Hep	Héparine
HEMC	H-EMC-SS
HNF	Héparine Non Fractionnée

HS	Héparane-sulfate
HSGAG	Glycosaminoglycanes à héparane-sulfate
IdoA	Acide iduronique
IgG	Immunoglobuline de classe G
KS	Kératane-sulfate
KO	<i>Knock-out</i>
α -LA	α -Lactalbumine
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matrice Extracellulaire
4-MO	4-méthylombélliférone
4-MOX	4-méthylombélliférone-7- β -D-xyloside
MMP	Métalloprotéase
NDST	<i>N</i> -déacétylase/ <i>N</i> -sulfotransférase
PAPS	3'phosphoadénosine-5'phosphosulfate
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PG	Protéoglycane
PG à HS	Protéoglycane à Héparane-sulfate
RE	Réticulum Endoplasmique
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
siRNA	<i>small interfering Ribonucleic Acid</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SRLP	<i>Small Rich Leucine Proteoglycans</i>
3-OST	3- <i>O</i> -sulfotransférase
SAM	S-Adenosyl-Méthionine
SGB	Simpson-Golabi-Behmel
SG ou Ser-Gly	Sérine-Glycine
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ST	Sulfotransférase
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBST	<i>Tris Buffer Saline Tween</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
UDP	Uridine di-Phosphate
VEGF	<i>Vascular Growth Factor</i>
Xyl	Xylose
XylT	Xylosyltransférase
XT-I	Xylosyltransférase I
XT-II	Xylosyltransférase II

Introduction bibliographique

PARTIE 1 : LES PROTEOGLYCANES ET LES GLYCOSAMINOGLYCANES

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules complexes composées d'une portion protéique portant des chaînes polysaccharidiques chargées négativement. Les PGs font l'objet d'un intérêt grandissant du fait de leurs propriétés structurales et fonctionnelles remarquables. Dotés d'une position stratégique au sein des matrices extracellulaires (MEC) ou à la surface des cellules eucaryotes, ils jouent un rôle essentiel dans l'organisation des tissus conjonctifs en interagissant avec d'autres constituants matriciels. Ils régissent également la biodisponibilité de nombreux médiateurs solubles régulant ainsi leur activité biologique. Ces molécules présentent donc un réel intérêt thérapeutique car de nombreux travaux mettent en cause la machinerie de biosynthèse des PGs ou les PGs eux-mêmes dans de multiples processus physiologiques et pathologiques tels que les cancers, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose et les arthropathies. Les PGs sont des macromolécules multi-facettes pouvant être considérées à la fois comme de potentielles cibles pharmacologiques et/ou comme de nouvelles molécules thérapeutiques.

I. STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES PGs

I.1 Les protéoglycanes

Les PGs sont constitués d'un squelette peptidique ou protéine « core » sur laquelle sont fixées de façon covalente au niveau de certains résidus sérine des chaînes hétéropolysaccharidiques linéaires appelées glycosaminoglycanes (GAGs).

On distingue essentiellement deux groupes de chaînes de GAG : les chondroïtine-sulfates/dermatane-sulfates (CS/DS) et héparine/héparane-sulfates (Hep/HS). La composition et la structure chimique des chaînes de GAG diffèrent d'un type de PG à l'autre et sont présentées dans la Figure 1. Le troisième groupe de GAG est représenté par les kératane-sulfates (KS) dans lesquels l'assemblage des chaînes se fait à partir de résidus sérine/thréonine ou asparagine. L'acide hyaluronique (HA) est un GAG particulier car il ne possède pas de région protéique et est constitué d'une longue chaîne unique constituée de plusieurs centaines de résidus glucidiques totalement dépourvus de groupements sulfates.

De manière générale, un PG (sauf dans le cas des PGs à KS) est construit selon un même schéma avec :

1. Une région protéique ou la protéine « core » comportant très souvent un motif sérine-glycine (Ser-Gly ou SG) sur lequel vient se greffer un résidu xylose à partir duquel s'effectue l'amorçage puis la polymérisation de la chaîne de GAG.

2. Une région de liaison ou « linkage region » constituée d'une amorce tétrasaccharidique xylose-galactose-galactose-acide glucuronique [Xyl β 1,4Gal β 1,3Gal β 1,3GlcA] fixée sur la protéine « core ».

3. L'élongation de cette amorce s'effectue par ajout successif des résidus glucidiques d'un même motif disaccharidique formant ainsi les chaînes de GAG.

La taille et la composition des chaînes de GAG, la séquence et l'arrangement des domaines de la protéine « core », ou bien encore la distribution et le degré de substitution des chaînes le long de la région protéique varient d'un PG à l'autre contribuant ainsi à augmenter leurs potentialités fonctionnelles.

I.2 Les chaînes de GAG

Les GAGs sont de longues chaînes polysaccharidiques linéaires constituées de la répétition d'un motif disaccharidique composé d'un sucre aminé, une *N*-Acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) ou une *N*-Acétyl-D-galactosamine (GalNAc) et d'un acide uronique (l'acide D-glucuronique (GlcA) ou l'acide L-iduronique (IdoA), son épimère en C5). La composition des unités disaccharidiques déterminera le type de GAG : GlcNAc-acide uronique dans le cas des Hep/HS, GalNAc-acide uronique dans le cas des CS/DS. Bien que possédant des caractéristiques communes, les GAGs se distinguent par la composition du motif disaccharidique, la sulfatation de ce motif et l'épimérisation de l'acide hexuronique (HexA) (Schwartz et Domowicz, 2002). Les nombreuses modifications telles que des *N*-déacétylations et des *O*- et *N*-sulfatations opérées sur les chaînes de GAG au cours de leur synthèse confèrent à ces molécules une grande diversité et complexité structurale.

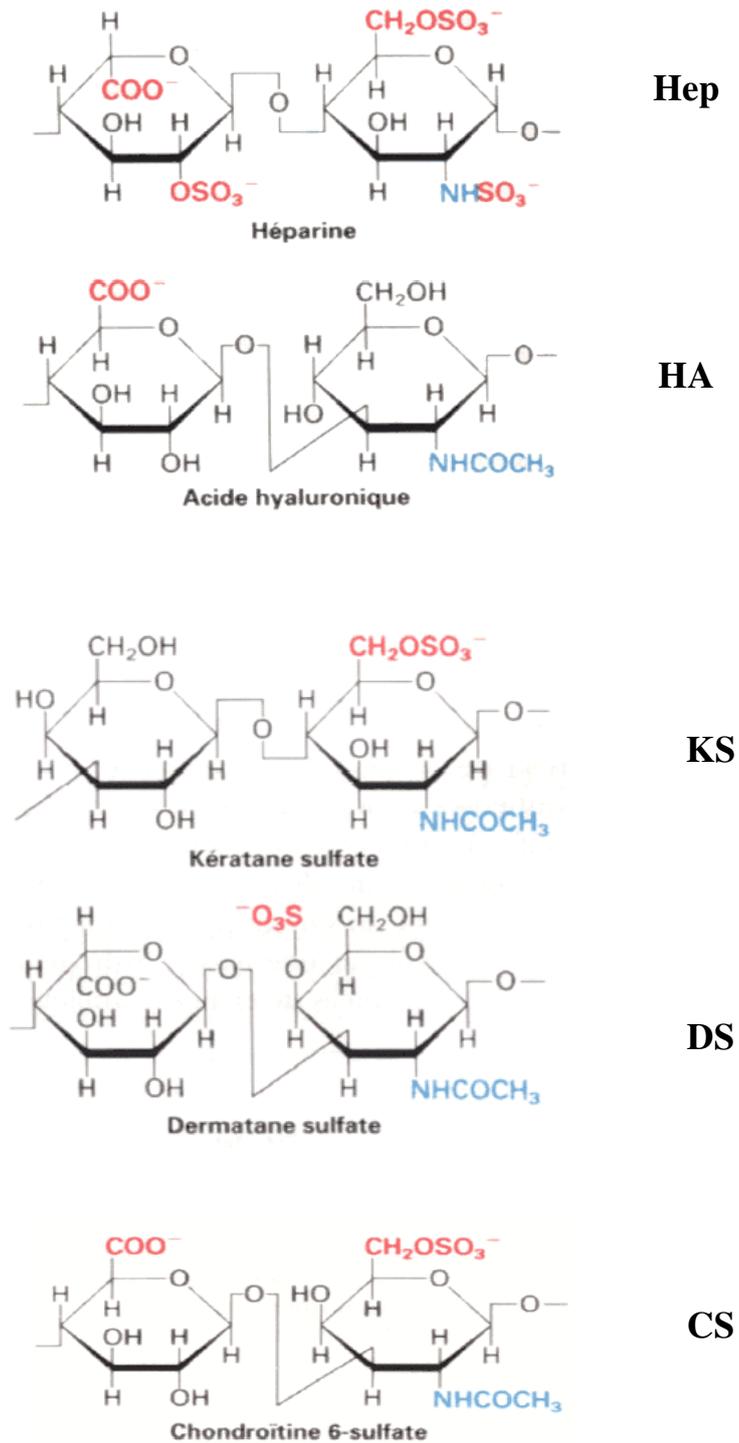


Figure 1. Représentation schématique des unités disaccharidiques élémentaires des différents GAGs

Les motifs disaccharidiques des GAGs sont constitués d'un sucre aminé (hexosamine) et d'un sucre de type hexuronique (ou galactose dans le cas des KS). Après polymérisation par répétition d'une même unité disaccharidique, ces monosides forment un polysaccharide non branché chargé négativement grâce à la présence des groupements carboxyliques et/ou sulfates. L'HA ne possède pas de groupements sulfates.

II. LES PGs, COMPOSANTS ESSENTIELS DES MEC

Les PGs existent au sein de toutes les matrices des tissus conjonctifs assurant ainsi leur homéostasie tissulaire et leur intégrité fonctionnelle en jouant le rôle d'organismes moléculaires. Par exemple, la matrice cartilagineuse schématisée en Figure 2 est constituée d'une variété de PGs essentiels aux propriétés physique/mécanique et biochimique du cartilage. Elle comprend un réseau collagénique complexe où interagissent entre eux l'agrécan, la décorine, l'HA et la fibromoduline. Cependant, au cours d'arthropathies telles que l'arthrose, la perte d'anabolisme des PGs associée à des modifications délétères de leurs chaînes de GAG et la rupture de l'homéostasie tissulaire, favorisent les processus de dégradation au détriment des mécanismes de biosynthèse et représentent des facteurs déterminants de la détérioration du cartilage et de la fonction articulaire.

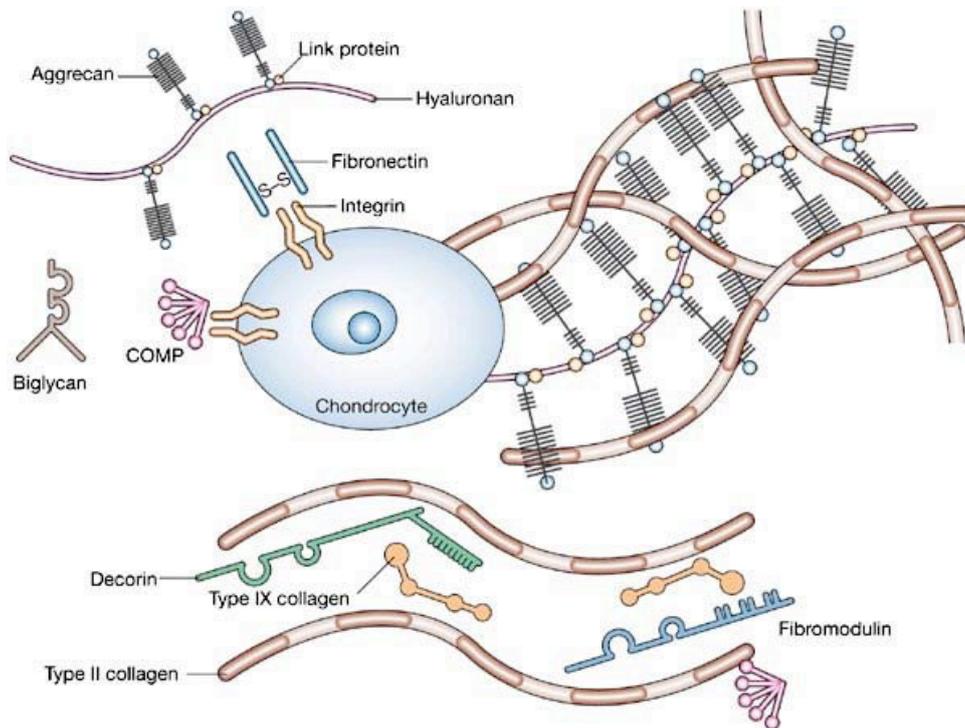


Figure 2 : Représentation schématique de la MEC du cartilage

Trois classes de protéines existent dans le cartilage : les collagènes (de type II principalement), des PGs de grande taille (essentiellement l'agrécane) et de petite taille (biglycan, décorine, fibromoduline), et les protéines non collagéniques (COMP ou « *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* », protéines de liaison, fibronectine). La décorine et la fibromoduline participent à l'organisation de la MEC en liant le collagène et contribuent à la cohésion du cartilage.

Source : www.nature.com

II.1 La famille des agrécanes

La famille du gène de l'agrécane est constituée de quatre membres : l'agrécane, le versican, le neurocane et le brévicane.

II.1.1 Structure et fonction de l'agrécane

L'agrécane constitue le PG majoritaire du cartilage. Il comporte de multiples domaines fonctionnels (Figure 3). Sa partie protéique est composée de trois domaines globulaires nommés G1, G2 et G3 contenant chacun des résidus cystéines qui établissent entre eux des ponts disulfures. Les régions G1 et G2 sont séparées par un court domaine interglobulaire (IGD, *Interglobular domain*) et les régions G2 et G3 sont séparées par une région de grande

taille sur laquelle sont fixées les chaînes de GAG (KS et CS). Le domaine G1 situé à l'extrémité *N*-terminale interagit avec l'HA, chaîne sur laquelle peuvent se fixer plus d'une centaine de molécules d'agrécane stabilisées par une protéine de liaison. La taille de chaque agrégat dépend de la longueur des chaînes d'HA, la proportion en protéine de liaison et la quantité d'agrécane. Le site d'attachement des CS est divisé en deux sous-domaines CS1 et CS2. Le domaine CS1 adjacent au domaine d'attachement des KS, est composé de nombreux motifs Ser-Gly répétés, dont le nombre varie en fonction des espèces. Chez l'homme, le domaine CS1 présente un polymorphisme de taille associé à un nombre variable de ces motifs Ser-Gly. Situé à l'extrémité *C*-terminale, le domaine G3 est composé de différents domaines structuraux qui sont essentiels aux modifications post-traductionnelles et au processus de sécrétion de l'agrécane. La structure de l'agrécane, notamment la proportion de chaînes de GAG, varie en fonction de l'âge en termes de nombre, longueur et degré de sulfatation (Roughley, 2006).

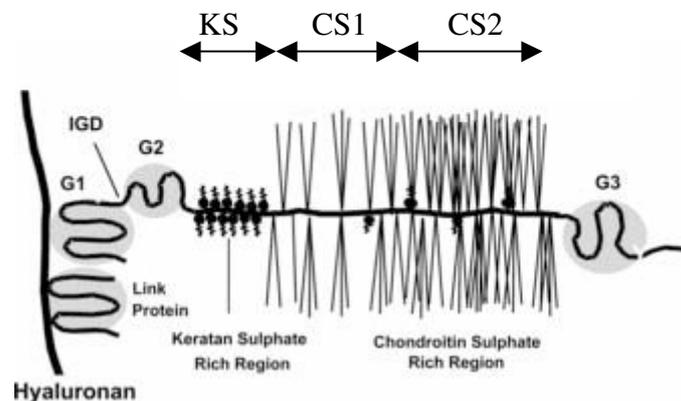


Figure 3 : Représentation schématique de l'agrécane

Les GAGs sont fixés sur une protéine porteuse qui comprend trois domaines globulaires (G1, G2 et G3). G1 et G2 sont situés au niveau de l'extrémité *N*-terminale et G3 au niveau de l'extrémité *C*-terminale. Entre ces deux domaines, se trouve une zone d'attachement de multiples chaînes de GAG (KS et CS). L'interaction de l'agrécane avec l'HA forme des agrégats stabilisés par une protéine de liaison. Le domaine IGD ou « *Interglobular domain* » sépare les régions G1 et G2.

Source : <http://www.biochemj.org/bj/386/0015/bj3860015f03.gif>

Au sein de la matrice cartilagineuse, l'agrécane est enclavé dans un réseau de fibres de collagène (de type II) où sont présents également d'autres PGs de petite taille, et des petites protéines non collagéniques. De par sa localisation et ses propriétés physicochimiques, il

assure en premier lieu un rôle structural et est à l'origine des propriétés de résistance aux forces de compression du tissu cartilagineux.

II.1.2 Pathologies liées à un déficit en agrécane

La qualité de la matrice cartilagineuse dépend fortement du contenu et de la taille de l'agrécane. Elle requiert également un grand nombre de chaînes de GAG qui contribuent aux propriétés rhéologiques du tissu cartilagineux. La perte de l'intégrité du cartilage au cours de l'arthrose est associée à une déficience en agrécane provenant soit d'un clivage protéolytique de sa partie protéique (induisant une diminution de la présence de charges négatives) ou soit d'un clivage de l'HA (conduisant à une diminution de la taille des agrégats). Au cours du vieillissement et lors de l'arthrose notamment, on observe également des altérations qualitatives et quantitatives des chaînes de CS se traduisant par une diminution de la longueur et du nombre des chaînes de CS, qui seront compensées par une augmentation de la taille et du nombre de chaînes de KS (Dudhia et al., 1996 ; Praillet et al., 1998). Les agrécanasés et métalloprotéases de la matrice sont responsables de la dégradation de l'agrécane.

De plus, des mutations du gène codant l'agrécane sont responsables de chondrodysplasies chez l'homme, la souris et le poulet. Chez l'homme, l'insertion d'une base nucléique dans la séquence génique codant l'agrécane conduit à un décalage du cadre de lecture à l'origine d'une forme de dysplasie spondylo-épiméphysaire (Roughley, 2006). De plus, il est décrit que l'absence de la région G3 de l'agrécane empêcherait probablement la sécrétion des molécules d'agrécanes mutées dans la ME.

Enfin, chez l'homme, les phénotypes chondrodystrophiques seraient associés à une plus faible sulfatation de l'agrécane due à un défaut de transport de sulfates (Superti-Furga et al., 1996).

II.2 LES SMALL RICH LEUCINE PROTEOGLYCANS ou SRLPs

Les SRLPs constituent un sous-groupe de la famille des protéines LRRs (*Leucine-Rich-Repeat*) caractérisées par de multiples domaines adjacents portant un motif commun riche en leucine (Roughley, 2006 ; Ameye et Young, 2002). Les SRLPs comptent treize membres dont la plupart sont des PGs sécrétés (Hocking et al., 1998). Dans le cartilage, on retrouve quatre types de SRLPs, la décorine et le biglycan (à CS ou DS), le lumican, et la fibromoduline (à KS). La région protéique est caractérisée par la présence de domaines riches en cystéines capables de former des ponts disulfures et peut également être *N*-glycosylée. La taille de la protéine porteuse de ces SRLPs est d'environ 40 kDa. Leur classification repose sur l'organisation génique, le nombre de domaines riches en leucine et le type de chaînes de GAG.

Leur forme en fer à cheval leur permet d'interagir avec les fibres de collagène (de type VI, XII, XIV) et d'autres composants matriciels tels que la fibronectine ou l'élastine (Scott, 1996). Elles assurent également un rôle de protection des fibrilles de collagène contre l'action des collagénases. Elles sont capables d'interagir avec des facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*) et le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*).

II.2.1 La décorine

Propriétés structurales et fonctionnelles de la décorine

Elle possède une protéine porteuse d'un poids moléculaire d'environ 36,5 kDa qui est *N*-glycosylée et est substituée par une chaîne unique de CS/DS au niveau de l'extrémité *N*-terminale (Figure 4). La protéine porteuse contient dix motifs riches en leucine (LRR) bordés par des ponts disulfures. Chaque domaine riche en leucine est composé d'une séquence LXXLXXNXL, où L désigne très souvent une leucine et X, n'importe quel autre acide aminé. Ces domaines servent de motifs structuraux dans divers processus moléculaires tels que l'adhésion cellulaire, la transduction de signaux cellulaires médiée par les facteurs de croissance. Le degré d'épimérisation de l'acide uronique en IdoA et la sulfatation de la chaîne de décorine varient d'un type tissulaire à l'autre.

La décorine interagit avec d'autres composants matriciels tels que les fibres de collagène et la fibronectine. De ce fait, elle contribue à la régulation du diamètre des fibrilles de collagène et modifie leur morphologie par des interactions spécifiques *via* sa partie protéique alors que la chaîne de CS/DS permettrait de maintenir l'espace interfibrillaire (Danielson et al., 1997). Elle est également capable de lier les facteurs de croissance tels que l'EGF et d'activer leurs voies de signalisation *via* son récepteur membranaire. En liant le TGF- β , elle régule son activité et possède ainsi une action inhibitrice sur la division cellulaire.

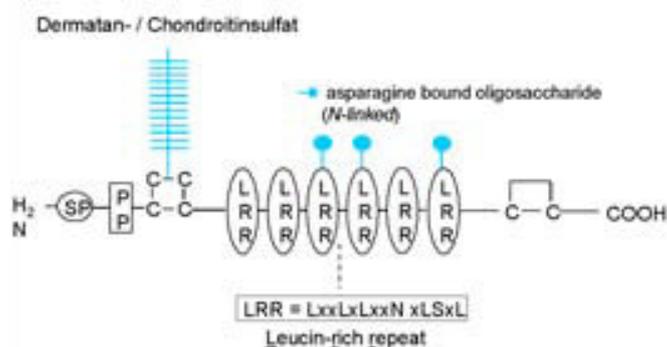


Figure 4 : Représentation schématique de la décorine

La décorine possède trois domaines distincts communs aux SRLPs. Au niveau de l'extrémité *N*-terminale, est fixée une chaîne unique de DS ou CS (en bleu) puis sa partie centrale comporte une dizaine de domaines riches en leucine. Elle possède également à ce niveau trois sites potentiels de *N*-glycosylation symbolisés par une épingle bleue.

Source : www.tu-dresden.de

Pathologies liées à un déficit en décorine

Les souris génétiquement déficientes (*knock-out*, KO) pour ce gène sont viables. Cependant l'absence de décorine provoque une fragilité de la peau qui est alors plus fine et flexible (Danielson et al., 1997). Les fibres de collagène se trouvent disposées de façon irrégulière et leur taille serait également affectée, soulignant ainsi le rôle fondamental de la décorine dans la régulation de la fibrillogénèse du collagène *in vivo*. Ce phénotype observé chez la souris se rapproche fortement de celui observé chez l'homme au cours du syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos caractérisé par des anomalies des tissus conjonctifs (Seidler et al., 2006).

Chez la souris, la décorine est utilisée comme agent anti-fibrotique afin d'empêcher le phénomène de fibrose musculaire mais permettrait également d'améliorer la réparation du tissu musculaire après blessure, par injection de décorine humaine recombinante. Ces injections contribueraient au rétablissement quasiment complet de la structure et de la fonction du muscle endommagé (Fukushima et al., 2001).

Comme indiqué précédemment, la décorine est capable de lier et de neutraliser l'activité biologique du TGF- β . Elle pourrait par conséquent être considérée comme un régulateur naturel de ce médiateur. Border et al. (1992) ont montré qu'elle pouvait antagoniser l'action du TGF- β *in vivo* dans des modèles de glomérulonéphrite. En effet, l'administration de

décorine par injection intraveineuse diminuerait l'accumulation de MEC dans les glomérules rénaux à l'origine de cette pathologie.

Enfin, elle serait également capable de contrôler la prolifération cellulaire et jouerait un rôle important dans les processus de croissance et progression tumorales (Bi et al., 2008). L'expression *in vitro* du gène de la décorine ou sa présence sous forme de protéine recombinante inhiberait leur prolifération cellulaire de nombreuses lignées tumorales. Il a été démontré que l'expression transitoire de décorine causerait une inhibition significative de la croissance de xénogreffes issues de tumeurs du colon (Reed et al., 2002). La thérapie génique basée sur l'administration de décorine recombinante pourrait donc représenter une nouvelle approche thérapeutique anti-cancéreuse (Reed et al., 2002).

II.2.2 Le biglycan

Il appartient à la même classe que la décorine et est substitué par deux chaînes de DS situées à l'extrémité *N*-terminale de la protéine « core ». Il est fortement exprimé dans le tissu osseux et est considéré comme un régulateur positif de la formation de l'os en contrôlant le pic de masse osseuse. En effet, la masse osseuse résulte d'une régulation fine entre les processus de formation par les ostéoblastes et de résorption par les ostéoclastes. Il a été décrit qu'une déficience de biglycan dans des souris génétiquement modifiées conduirait à une différenciation des ostéoclastes et par conséquent, une résorption osseuse plus importante comparativement aux souris servant de contrôles (Bi et al., 2006).

Pathologies liées à un déficit en biglycan

Chez la souris, une déficience d'origine génétique en biglycan induit une croissance osseuse plus lente comparativement au phénotype sauvage. Ces souris développeraient un phénotype de type « ostéoporose » avec de sévères diminutions de la formation osseuse dès l'âge de six mois (Bi et al., 2006). Elles n'atteindraient pas le pic de croissance osseuse du fait d'un nombre d'ostéoblastes et d'une activité ostéoblastique réduits. Ces souris sont utilisées comme modèles d'étude de l'ostéoporose.

Enfin, le biglycan est capable de se lier à l' α -dystrophine localisée au niveau des membranes des cellules musculaires où des anomalies de cette protéine pourraient jouer un rôle dans les dystrophies musculaires (Fadic et al., 2006).

II.2.3 La fibromoduline et le lumican

La fibromoduline est présente de façon abondante dans les tendons. Elle possède un domaine riche en leucine contenant cinq résidus asparagines et peut fixer simultanément à ce niveau jusqu'à quatre chaînes de KS. La fibromoduline serait impliquée dans la régulation de l'orientation des fibres de collagène dans les MEC.

Le lumican est un PG à KS qui ressemble fortement à la fibromoduline. C'est un composant majeur de la cornée mais il est exprimé également dans les muscles, la matrice cartilagineuse, les reins, les poumons et les intestins.

Pathologies liées à un déficit de fibromoduline ou de lumican

Chez la souris, l'absence de fibromoduline induite de manière génétique ne produit pas de changements notables dans l'apparence mais résulte en une organisation anormale des fibres de collagène au niveau des tendons.

L'absence de lumican dans des modèles animaux provoque une laxité de l'appareil tégumentaire et une opacité de la cornée avec une proportion accrue de fibres de collagène épaisses. Chez l'homme, au cours de la dystrophie maculaire cornéenne, le lumican ne possède pas de chaînes de KS et se présente sous la forme d'un PG immature. De plus, il a été démontré que le lumican inhibait la croissance et la progression des mélanomes dans un modèle expérimental de souris en régulant la migration cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Vuillermoz et al., 2004).

Bien que des phénotypes distincts aient été développés chez la souris, par répression d'un gène codant une SRLP précise, l'analyse de souris doublement déficientes démontre l'existence de mécanisme de compensation ou de survie, suggérant des propriétés fonctionnelles redondantes des PGs de la famille des SRLPs.

III. LES PGs MEMBRANAIRES

Les PGs membranaires sont pour la plupart, des PGs à héparane-sulfates (PGs à HS). Ils sont localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules, mais peuvent également exister sous forme soluble. Ils regroupent essentiellement la superfamille des syndécans et des glypicans. Situés à la surface des cellules, ils régissent de nombreux processus biologiques (schématisés ci-dessous) tels que les interactions cellule-cellule, cellule-matrice, la prolifération cellulaire et sont également capables de jouer le rôle de co-récepteur membranaire.

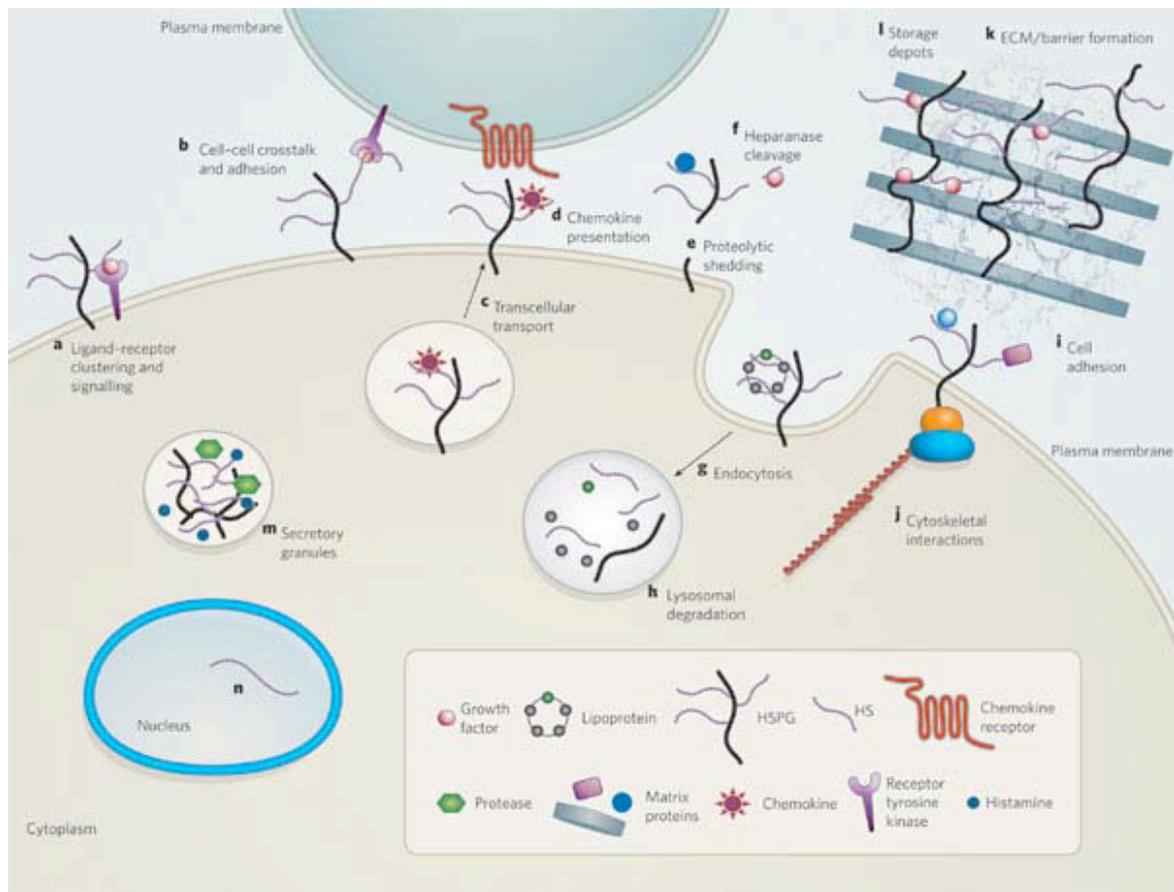


Figure 5 : Fonctions des PGs à HS au sein des cellules

Situés à la surface d'une même cellule ou sur des cellules environnantes, les PGs à HS agissent comme co-récepteurs des récepteurs à tyrosine kinase des facteurs de croissance (a). Ils peuvent transporter des chemokines à travers les cellules et assurent leur présentation à la surface cellulaire (d). Le relargage des syndécans et glypicans membranaires sous l'action de protéases (e) permet à l'héparanase de cliver les chaînes de HS libérant ainsi les ligands préalablement fixés (f). Les PGs à HS présents à la surface cellulaire sont activement internalisés par endocytose (g) et sont dégradés dans les lysosomes (h) ou recyclés à la surface des cellules (c). Les PGs à HS facilitent également l'adhésion cellulaire à la MEC (i) ou vers d'autres cellules (b). Ils sont également capables d'interagir avec le cytosquelette (j). Les PGs à HS sécrétés sont impliqués dans la formation de la MEC qui forme une barrière physiologique (k) et séquestrent les facteurs de croissance pour un relargage ultérieur (l). La serglycine porte des chaînes d'Hep fortement sulfatées et est localisée dans les granules des cellules hématopoïétiques (m).

Source : Bishop et al., 2007

III.1 La famille des syndécans

Chez les vertébrés, on dénombre quatre types de syndécans : le syndécane-1, le syndécane-2 (fibroglycan), le syndécane-3 (*N*-syndécane) et le syndécane-4 (amphiglycan ou ryudocan) représentés dans la Figure 6. Un homologue des syndécans a été identifié chez la drosophile et *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

L'expression des syndécans est fortement régulée et est spécifique d'un type cellulaire. Le syndécane-1 est présent essentiellement dans les cellules épithéliales. Le syndécane-2 est retrouvé de façon abondante dans les cellules mésenchymateuses alors que le syndécane-3 est exprimé de façon prépondérante dans le système nerveux.

III.1.1 Structure des syndécans

Les gènes codant la superfamille des syndécans sont issus de la duplication d'un gène ancestral où les domaines transmembranaire et cytoplasmique sont des régions très conservées. Ce sont des protéines transmembranaires de type I avec une séquence peptide signal située à l'extrémité *N*-terminale, un ectodomaine contenant de nombreuses séquences consensus dédiées à l'attachement des chaînes de GAG, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique situé à l'extrémité *C*-terminale. Le domaine transmembranaire a la particularité de posséder des résidus d'acides aminés avec une courte chaîne latérale (glycine) espacés de façon régulière. Leur domaine cytoplasmique contient deux séquences conservées (C1 et C2) interrompues par une région variable (V), spécifique d'un type de syndécane, permettant ainsi l'interaction avec différentes molécules cytoplasmiques. Les syndécans portent habituellement trois chaînes de HS à proximité de l'extrémité *N*-terminale bien que la substitution par une autre chaîne de GAG de type CS soit également possible.

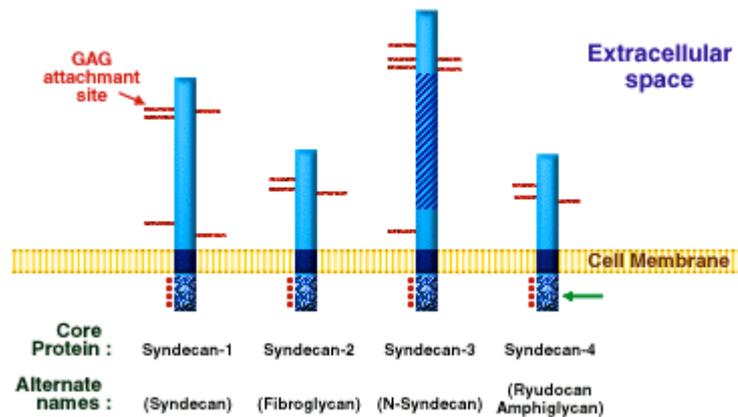


Figure 6 : Représentation schématique de la famille des syndécans

Les syndécans sont des protéines transmembranaires. Leur région protéique possède de trois à cinq chaînes d'HS et/ou CS qui leur permettent de lier un grand nombre de ligands extracellulaires. La famille des syndécans compte quatre membres chez les vertébrés. Ils possèdent une séquence peptide signal *N*-terminale, un ectodomaine, un domaine transmembranaire unique et une courte extrémité *C*-terminale cytoplasmique.

Source : <http://www.glycoforum>

III.1.2 Fonctions biologiques

Le nombre et la position des chaînes de GAG des syndécans sont conservés, suggérant que la fonction principale du domaine extracellulaire est de présenter la chaîne glycosaminoglycanique à la surface des cellules selon une orientation particulière à chaque type de syndécan. Ils assurent la liaison avec de nombreux ligands extracellulaires *via* la chaîne de HS jouant le rôle d'attache non-covalente.

Les PGs membranaires et leurs chaînes de GAG peuvent être libérés dans la MEC ou dans la circulation sanguine par clivage endoglycosidique ou protéolytique. Les PGs subissent, comme les protéines membranaires, les processus d'endocytose et de dégradation lysosomales.

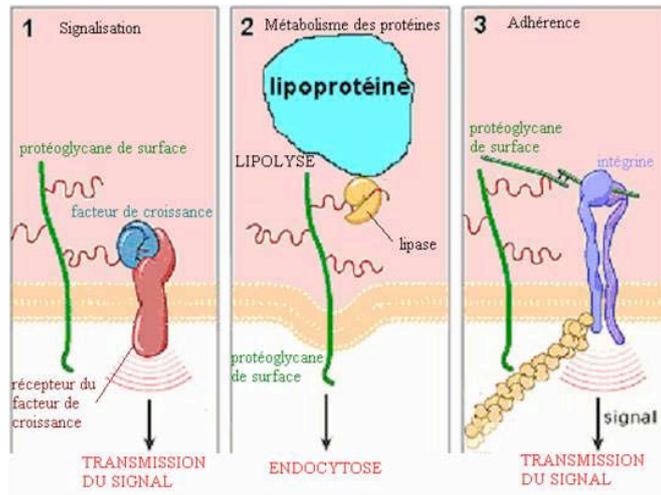


Figure 7 : Exemple de trois fonctions exercées par les PGs à HS membranaires dans la cellule

(1) Les PGs à HS membranaires interviennent dans les voies de signalisation en jouant le rôle de co-récepteur et favorisent ainsi la liaison entre un facteur de croissance et son récepteur membranaire. (2) Ils participent également à la lipolyse des lipoprotéines en liant des lipases permettant ainsi leur endocytose et leur dégradation. (3) Ils participent au phénomène d'adhérence cellulaire en liant les intégrines de la surface membranaire réalisant ainsi un pont avec le cytosquelette.

III.1.3 Exemple du syndécan-1 et implication dans le myélome multiple des os

Le syndécan-1 est exprimé à la surface basolatérale des cellules épithéliales (Elenius et Jalkanen, 1994). Sa protéine porteuse est constituée d'un court domaine cytoplasmique, d'une région transmembranaire et d'un domaine extracellulaire sur lequel sont fixées des chaînes de HS et de CS capables d'interagir avec d'autres constituants de la matrice tels que les collagènes, la fibronectine et des médiateurs solubles comme le bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*). De par sa localisation membranaire, il établit un pontage direct entre les constituants matriciels et le cytosquelette *via* son domaine intracellulaire (Praillet et al., 1998). Le myélome multiple désigne un cancer hématologique se développant à partir des plasmocytes de la moelle osseuse. Le syndécan-1 représente un régulateur majeur au niveau de la moelle osseuse et peut s'avérer être un facteur critique favorisant la croissance du myélome et l'invasion métastatique. Il serait retrouvé de façon abondante et très majoritaire au niveau de la surface des cellules cancéreuses et agirait donc comme un promoteur de progression tumorale. Le syndécan-1 clivé sous l'action des protéases et donc devenu circulant, serait présent à de fortes concentrations dans le sérum de patients atteints de

myélome. Son dosage pourrait servir d'indicateur de diagnostic de ce cancer (Sanderson et Yang, 2008). Ainsi, le ciblage thérapeutique du syndécan-1 ou des chaînes de HS permet de bloquer la croissance du myélome *in vivo* et permet d'envisager le développement de nouvelles thérapeutiques anti-cancéreuses.

III.2 Les glypicans

Ce sont des PGs à HS ancrés dans la membrane cellulaire *via* une molécule de glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). La famille des glypicans regroupe six membres chez l'homme et son orthologue *dally* existe chez la drosophile. Ils sont fortement exprimés durant le développement du système nerveux central. Les glypicans moduleraient la réponse cellulaire aux protéines BMP (*Bone Morphogenic Proteins*) et à l'IGF-2 (*Insulin-like growth factor-2*), tous deux étant des médiateurs importants de la division et de la différenciation cellulaires (Sasisekharan et al., 2002). De plus, la distribution tissulaire des glypicans varie entre le stade embryonnaire et l'âge adulte, soulignant l'importance des différents variants de glypican durant la morphogénèse. Ils sont largement exprimés dans le système nerveux, les reins et de façon moindre dans les muscles lisses et squelettiques.

III.2.1 Structure des glypicans

La protéine porteuse (60-70 kDa) des glypicans possède quatorze cystéines conservées formant une région globulaire *via* des ponts disulfures. Cette région globulaire comporte trois à quatre sites d'attachement exclusifs des chaînes de HS, le tout formant un large domaine extracellulaire (Figure 8). La région protéique présente de 20 à 50% d'homologie de séquence d'un type à l'autre. Le domaine *N*-terminal contient une séquence peptide signal permettant la translocation vers le lumen du réticulum endoplasmique (RE) et possède des sites de *N*-glycosylation. La séquence consensus DSGSGSG pour l'attachement des chaînes de GAG est située entre le domaine central et l'extrémité *C*-terminale. Cette portion *C*-terminale possède la séquence signal nécessaire à l'insertion des glypicans au niveau de la membrane plasmique des cellules *via* l'ancre GPI.

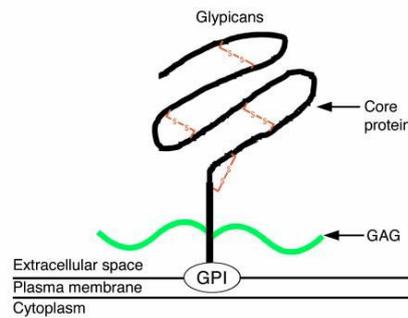


Figure 8 : Représentation schématique des glypicans

Les glypicans sont une famille de PGs à HS liés à la surface des cellules par une ancre GPI. Ils possèdent une extrémité *N*-terminale correspondant à la séquence peptide signal de translocation et une extrémité *C*-terminale globulaire où vient se fixer le GPI. La présence de quatorze résidus cystéines permet la création de ponts disulfures intra-moléculaires responsables d'une structure tridimensionnelle globulaire qui est très similaire d'un glypican à l'autre. Les sites d'insertion des chaînes de HS se feraient essentiellement au niveau des cinquante derniers acides aminés de l'extrémité *C*-terminale.

Source : Filmus et Selleck, 2001

III.2.2 Fonctions biologiques

Les glypicans sont capables par des interactions électrostatiques *via* leurs chaînes de HS, de stabiliser l'interaction du ligand avec son récepteur ou de jouer un rôle de co-récepteur de faible affinité. Les glypicans peuvent être libérés sous l'action de la phosphatidylinositol phospholipase C, D et/ou de protéases. Ils peuvent en piégeant des ligands extracellulaires en contrôler la diffusion. Ils interviennent au niveau de la signalisation et le transport des facteurs de croissance. Il a été démontré que le glypican-1 est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire dans certains types de tumeurs. Il est également considéré comme un chaperon extracellulaire pour le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dont il potentialise la voie de signalisation. De plus, des expériences menées *in vitro* ont montré que le glypican-1 facilite l'interaction du FGF-2 (*Fibroblast Growth factor 2*) avec son récepteur et stimule ainsi sa voie de signalisation.

Il a été montré que le glypican-3 est surexprimé dans les carcinomes hépatocellulaires, constituant un nouveau marqueur moléculaire de tumeur. Komori et al. (2006) ont notamment rapporté une inhibition de l'expression de glypican-3 chez des souris pré-immunisées par des injections dans la cavité péritonéale, d'une suspension de cellules dendritiques présentant au niveau de leur complexe majeur d'histocompatibilité des peptides de glypican-3. Ces résultats suggèrent la possibilité de développer des immunothérapies basées sur l'emploi de peptides

du glypican-3 en particulier pour le traitement de patients souffrant de carcinomes hépatocellulaires (Komori et al., 2006).

III.2.3 Exemple du glypican-3 et implication pathologique dans le syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGB)

Le syndrome SGB est une maladie génétique liée au chromosome X se manifestant par une croissance excessive à la naissance avec une taille disproportionnée de la langue et des anomalies rénales. Connaissant le rôle du glypican-3 dans la régulation de la prolifération et/ou l'apoptose des cellules durant le développement, on suppose que la perte de fonction de ce PG causée par une mutation, serait à l'origine de ce syndrome (Filmus et Selleck, 2001).

III.3 Implication des PGs à HS dans le processus cancéreux

Les chaînes de HS matricielles ou présentes à la surface des cellules forment des complexes polysaccharidiques ubiquitaires régulant de nombreux aspects de la biologie du cancer tels que la tumorigenèse, la progression tumorale et métastatique (Sasisekharan et al., 2002). Les cellules devenues cancéreuses modulerait la croissance et leur pouvoir métastatique par des modifications de la composition, la densité et la distribution des charges négatives et la séquence des HS membranaires. En effet, Esko et al. (1987) décrivent des cellules d'ovaires de hamster chinois déficientes en HS incapables d'induire la formation de tumeurs *in vivo*. Outre leur rôle dans la transformation initiale des cellules, les HS membranaires, qualifiés de « pro-oncogènes », lieraient des facteurs de croissance, des cytokines et des protéines structurales impliqués dans la régulation des voies de signalisation autocrine et paracrine, nécessaires à la progression tumorale. Des études *in vivo* chez la souris montrent que les changements de la structure des HS pro-oncogènes membranaires et matriciels ont un impact sur la cinétique de croissance des cellules tumorales et la formation des métastases (Liu et al., 2002).

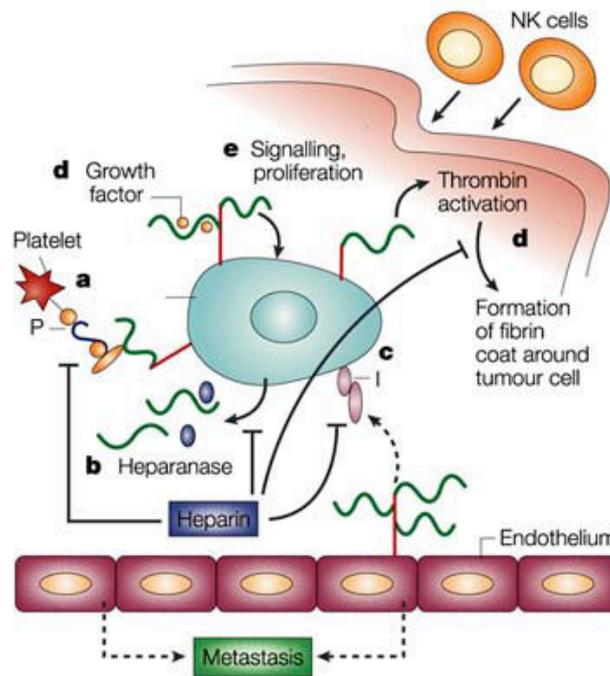
De plus, les HS présents à la surface des cellules endothéliales sont capables de moduler l'angiogenèse. Cet événement constitue une étape clé dans le processus tumoral. Il regroupe l'ensemble des mécanismes cellulaires qui participent à la formation de nouveaux capillaires sanguins suite à un stimulus permettant de répondre aux besoins nutritionnels de la tumeur ou des métastases. Les HS des cellules endothéliales pourront soit inhiber, soit promouvoir la néovascularisation des tissus, en régulant la signalisation médiée par les récepteurs cellulaires des facteurs FGF-2 ou VEGF (Figure 9). Toutefois, la situation s'avère plus complexe car

certaines PGs à HS (notamment les glypicans) seraient également capables de lier des molécules à activité anti-angiogénique comme l'endostatine.

Bien que la MEC constituée notamment de collagènes, de PGs et de glycoprotéines, constitue une barrière physique aux métastases durant l'invasion tumorale, les cellules tumorales secrètent des enzymes (métalloprotéases, héparanase et hyaluronidases) aptes à dégrader à la fois des protéines et des composants polysaccharidiques des matrices, favorisant ainsi leur croissance et leur dissémination (Figure 9).

Certaines études cliniques examinent les propriétés anti-cancéreuses d'HS exogènes sulfatés. L'Hep est un HS fortement sulfaté largement employé en clinique pour ses propriétés anti-coagulantes. Actuellement, elle est envisagée comme agent anti-cancéreux et ces travaux ouvrent des perspectives très prometteuses vers de nouvelles thérapies basées sur l'emploi d'oligosaccharides sulfatés ou de leurs analogues à visée anti-tumorale (Sanderson, 2001).

En outre, il est décrit que les PGs à CS joueraient également un rôle important dans le processus de cancérogenèse. De manière générale, les PGs à CS extracellulaires (tels que le versican ou le brévicane) ou membranaires possèdent une activité pro-tumorale alors que les PGs matriciels de la famille des SRLPs (tels que le lumican et la décorine) ont des propriétés anti-tumorales (Wegrowski et Maquart, 2006). Dans le cadre de cette thèse, nous avons focalisé nos travaux sur les voies de biosynthèse des HS.



Nature Reviews | Cancer

Figure 9 : Rôle des chaînes de HS dans la progression métastatique

Les chaînes de HS sont figurées en vert. (a) les PGs à HS portés à la surface des cellules tumorales peuvent jouer le rôle de ligands de P-sélectine (P) qui est elle-même responsable de l'adhésion des plaquettes ou à l'endothélium permettant la diapédèse des cellules cancéreuses, leur entrée dans la circulation sanguine et la métastase vers d'autres organes. (b) Les héparanases en clivant les chaînes de HS participent à la libération de facteurs de croissance et favorisent ainsi les métastases. (c) Les PGs à HS membranaires jouent le rôle de co-récepteurs des intégrines (I) permettant ainsi l'adhésion des cellules cancéreuses aux vaisseaux sanguins pour favoriser la diapédèse. L'Hep jouerait un rôle d'agent anti-tumoral à ce niveau en compromettant la liaison intégrine-PGs à HS. (d) Les HS pro-oncogènes possèdent des séquences capables de moduler le phénomène de coagulation. (e) Les HS des cellules tumorales interagissent avec des facteurs de croissance (ronds orange) tels que le FGF et le VEGF pour réguler la prolifération et la migration des cellules tumorales par des mécanismes autocrines.

Source : http://www.nature.com/gate1.inist.fr/nrc/journal/v2/n7/fig_tab/nrc842_F2.html

IV. PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES BASEES SUR LES MULTIPLES PROPRIETES DES PGs

De nombreuses pathologies sont directement liées à un déficit ou une perturbation en PG dont quelques exemples sont répertoriés dans le tableau suivant.

Type	PG affecté	Pathologie	Déficit biochimique
PGs à CS	agrécane	arthrose	altération de l'agrécane matriciel modifications qualitatives et quantitatives des chaînes de CS (et KS)
	décorine	syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos dystrophie musculaire	absence de chaîne de CS/DS augmentation d'expression
PGs à KS	lumicane	dystrophie maculaire de la cornée	absence de KS ou de sulfatation des KS
PGs à HS	glypican-1	cancer du sein	surexpression
	glypican-3	syndrome Simpson-Golabi-Behmel	mutations non fonctionnelles
		cancer du sein	diminution d'expression
	syndécan-1	carcinome hépatocellulaire	surexpression
carcinome utérin myélomes multiples		surexpression diminution d'expression	

Tableau 1 : Pathologies associées à une déficience ou surexpression d'un PG

IV.1 Les chondroïtine-sulfates (CS) et la glucosamine

Les chondroïtine-sulfates (CS) sont des polysaccharides polysulfatés, et font partie des constituants physiologiques et essentiels du cartilage. Délivrés aux patients dans le traitement de l'arthrose, ou utilisés comme complément alimentaire dans le cas de la glucosamine, l'efficacité thérapeutique et les mécanismes d'action de ces molécules sur les pathologies articulaires font encore l'objet de nombreuses controverses. Actuellement, les préparations à bases de CS sont commercialisées sous deux formes appelées Chondrosulf® et Structum®.

Des études cliniques montrent que la préparation Chondrosulf® produirait des effets bénéfiques comparativement au placebo, quelque soit la posologie quotidienne (800 mg à 1200 mg) alors que le Structum® ne présenterait pas d'effets significatifs (Pertuiset, 2002). Les CS absorbés possèderaient un tropisme articulaire et atteindraient les articulations sous formes natives et dépolymérisées. Des études expérimentales suggèrent que ces CS auraient des propriétés anti-inflammatoires, anaboliques et anti-cataboliques et amélioreraient également les propriétés élastiques du cartilage articulaire.

Dans le cartilage adulte humain, les sulfatations des CS se font en position 4 et 6 du résidu GalNAc, mais c'est la forme C6S qui prédomine. La plupart des préparations de CS commerciales sont des mélanges hétérogènes mais il se pourrait que le type de sulfatation joue un rôle dans leurs propriétés anti-inflammatoires (Ronca et al., 1998).

La glucosamine fait partie des composants des chaînes glycosaminoglycaniques du cartilage. Au cours la voie de biosynthèse des hexosamines, elle est *N*-acétylatée puis activée sous la forme d'un UDP-sucre et joue ainsi un rôle de précurseur dans la voie des hexosamines. La glucosamine commerciale est extraite à partir de tissus de crustacés tels que le crabe et les langoustes. Elle favoriserait la formation et la réparation du cartilage endommagé. Sa préparation sous forme de sel de chlorure permet sa commercialisation car la glucosamine sulfatée est extrêmement hygroscopique.

L'intérêt de son usage dans le traitement contre l'arthrose résiderait en ses propriétés anti-cataboliques sur la matrice cartilagineuse. Chez l'adulte, les TGF- β participent à l'équilibre entre les processus de dégradation et d'anabolisme de la matrice cartilagineuse. De façon intéressante, la glucosamine permettrait l'augmentation de l'expression des ARNm codant le TGF- β 1 dans des cultures de chondrocytes en monocouche et tridimensionnelle (Varghese et al., 2007). Cependant, à ce jour, les études réalisées sur les éventuels effets bénéfiques de la glucosamine ne s'accordent pas quant à un réel effet sur la synthèse matricielle et la diminution de la douleur.

IV.2 Les xylosides

Ce sont des monosaccharides (xylose) liés à une aglycone hydrophobe permettant leur pénétration au sein des cellules. Les xylosides sont capables d'interférer avec la synthèse des PGs en court-circuitant la voie de biosynthèse des chaînes de GAG endogène, produisant ainsi des chaînes de GAG dépourvues de protéine « core » (Kolset et al., 1990). La sécrétion de PGs endogènes sera ou non inhibée en fonction de la dose de xyloside. Les cellules traitées produisent des chaînes polysaccharidiques dont la taille diminue au fur et à mesure que les

doses de xyloside augmentent (Kolset et al., 1986). De plus, il est intéressant de noter que seuls les xylosides analogues au motif naturel Xyl-Ser-Gly et possédant une liaison anomérique de type β , exercent des effets cellulaires. De plus, l'impact de ces molécules sur le comportement de la cellule diffère notamment en fonction de la nature de l'aglycone.

Les xylosides constituent des molécules pharmacologiques intéressantes car elles sont capables de participer aux voies de biosynthèse des PGs et à la régulation de nombreuses activités cellulaires telles que la croissance cellulaire. En effet, une forte production de chaînes de CS libres associée à une inhibition significative et réversible de la prolifération cellulaire dans une lignée de monoblastes U-937 consécutive à l'ajout d'hexyl- β -D-thioxyloside dans le milieu de culture, a été montrée (Kolset et al., 1990). Bien que l'effet anti-prolifératif observé n'ait pas pu être rigoureusement attribué à l'augmentation de synthèse de chaînes de CS libres, les auteurs supposent que cette stimulation de biosynthèse de CS affecterait la biodisponibilité de précurseurs impliqués dans la synthèse de l'HA intervenant durant la mitose des cellules fibroblastiques (Brecht et al., 1986 ; Matuoka et al., 1987).

Mani et al., (1998) observent également des effets inhibiteurs des xylosides sur la prolifération de différentes lignées tumorales. Ces effets s'expliqueraient soit par une compétition avec la voie de biosynthèse d'un PG endogène qui serait essentiel à la croissance cellulaire, ou soit par l'absence de partie protéique sur ce type de chaînes de GAG (Mani et al., 1998).

De plus, de récentes études suggèrent que les CS exerceraient des effets anti-fibrotiques en inhibant la transcription des collagènes de type I et III dans des fibroblastes humains atteints de sclérodémie (Renard et al., 2008).

IV.3 L'Hep et ses dérivés

La serglycine est le seul PG intracellulaire connu avec une région protéique composée d'une répétition de huit motifs Ser-Gly sur lesquels s'effectuent l'initiation et la synthèse des chaînes d'Hep. L'Hep est une molécule fortement sulfatée, de longue taille comportant des motifs disaccharidiques linéaires et répétés. Après clivage à partir de la serglycine, elle est stockée dans des granules de sécrétion des mastocytes qui bordent les vaisseaux sanguins et sera libérée au cours des réactions inflammatoires (Niers et al., 2007).

Les Héparines Non Fractionnées ou HNF (12-14 kDa) sont des molécules utilisées en clinique et extraites à partir de tissus de porc ou de bœuf. Les Héparines de Bas Poids Moléculaire ou HBPM désignent des molécules dérivées des HNF par dépolymérisation chimique ou

enzymatique et possèdent un poids moléculaire trois fois inférieur à l'Hep, soit environ 5 kDa. Elles sont préparées par différentes méthodes de dégradation et diffèrent les unes des autres par leurs propriétés pharmacocinétiques et anti-coagulantes.

Il a été récemment observé que l'administration de HBPM prolongeraient la survie de patients atteints de cancer et par conséquent, les dérivés de l'Hep suscitent un intérêt particulier comme molécules à visée anti-tumorale (Harenberg et al., 2009). Il a été suggéré que de fortes doses d'Hep et d'Hep chimiquement modifiées inhiberaient la croissance des tumeurs primaires dans différents modèles expérimentaux de cancer. De plus, ces héparines modifiées constitueraient de puissants inhibiteurs des héparanases et sont synthétisées en vue de minimiser leurs effets anti-coagulants et d'augmenter leur potentialité inhibitrice sur la croissance tumorale et métastatique. En entrant en compétition avec les PGs à HS, elles auraient des effets sur l'adhésion cellulaire des cellules tumorales, la dégradation de la MEC, et l'angiogenèse. Ces propriétés anti-métastatiques s'expliqueraient également par une inhibition de la coagulation sanguine, une inhibition des interactions entre les plaquettes cancéreuses et l'endothélium durant la dissémination intravasculaire, et une inhibition de l'invasion cellulaire et de l'angiogenèse (Niers et al., 2007).

Enfin, la connaissance de la composition de la structure pentasaccharidique nécessaire à la liaison de l'antithrombine III a permis la conception de nouvelles molécules chimiques dotées des mêmes propriétés antithrombotiques que l'Hep. Fondaparinux® représente le premier pentasaccharide synthétique disponible sur le marché et commercialisé sous le nom d'Arixa. Les perspectives de développement de composés chimiques avec des propriétés antithrombotiques sont encourageantes car la chimie des sucres offre la possibilité de concevoir des molécules avec des structures précises et capables de cibler spécifiquement les protéases à sérine (antithrombine III et facteur Xa) impliquées dans la cascade de coagulation (Petitou et van Boeckel, 2004).

PARTIE 2 : LES VOIES DE BIOSYNTHESE ET DE MODIFICATION DES PROTEOGLYCANES

La compréhension des voies de biosynthèse et la connaissance de la structure des GAGs suscitent un fort intérêt en raison d'un nombre croissant de travaux mettant en évidence des perturbations de leur métabolisme au cours de multiples situations pathologiques. Le rôle des chaînes de GAG considérées initialement essentiellement comme des déterminants structuraux des MEC a été étendu à celui d'éléments clés dans la régulation de nombreux processus biologiques. De ce fait, les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des PGs s'avèrent être des cibles pharmacologiques prometteuses.

I. LES VOIES DE BIOSYNTHESE DES GAGs

La biosynthèse d'un PG débute par la formation d'une région protéique sur laquelle viennent se greffer successivement quatre résidus glucidiques pour former une amorce tétrasaccharidique à partir de laquelle sont ensuite polymérisées les chaînes de GAG par ajout successif de motifs disaccharidiques synthétisés par la cellule. Ces voies de biosynthèse nécessitent l'action coordonnée et concertée de nombreuses enzymes (glycosyltransférases ou GTs, épimérasés, sulfotransférases ou STs) présentes au niveau de la membrane du RE et dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi.

I.1 Synthèse de l'amorce tétrasaccharidique

La synthèse de l'amorce [Xyl β 1,4Gal β 1,3Gal β 1,3GlcA] débute de manière identique pour les chaînes de CS/DS et Hep/HS. Elle est initiée par l'addition d'un α -D-xylopyranose (Xyl) sur un résidu sérine catalysée par les xylosyltransférases I et II (XT-I et XT-II) (Götting et al., 2000), puis l'addition de deux résidus α -D-galactopyranose (Gal) se fait sous l'action des β 1,4-galactosyltransférase 7 (β 4GalT7) (Almeida et al., 1999) et β 1,3-galactosyltransférase 6 (β 3GalT6) (Bai et al., 2001) respectivement. Le transfert de GlcA au niveau du deuxième résidu Gal du trisaccharide [Xyl β 1,4Gal β 1,3Gal] est assuré par la β 1, 3-glucuronosyltransférase I (GlcAT-I) complétant l'assemblage de cette amorce (Kitagawa et al., 1998). Ensuite, l'élongation des chaînes glycosaminoglycaniques est catalysée par des HS-synthases (EXTL1/2/3, EXT1/2) (Kim et al., 2001 ; Kitagawa et al., 1999 ; Lind et al., 1998) d'une part, et des CS-synthases (Kitagawa et al., 2001 ; Yada et al., 2003a ; Yada et al., 2003b) d'autre part, pour former respectivement des chaînes de Hep/HS ou de CS/DS. Les GTs mentionnées ci-dessus sont présentées dans la Figure 10.

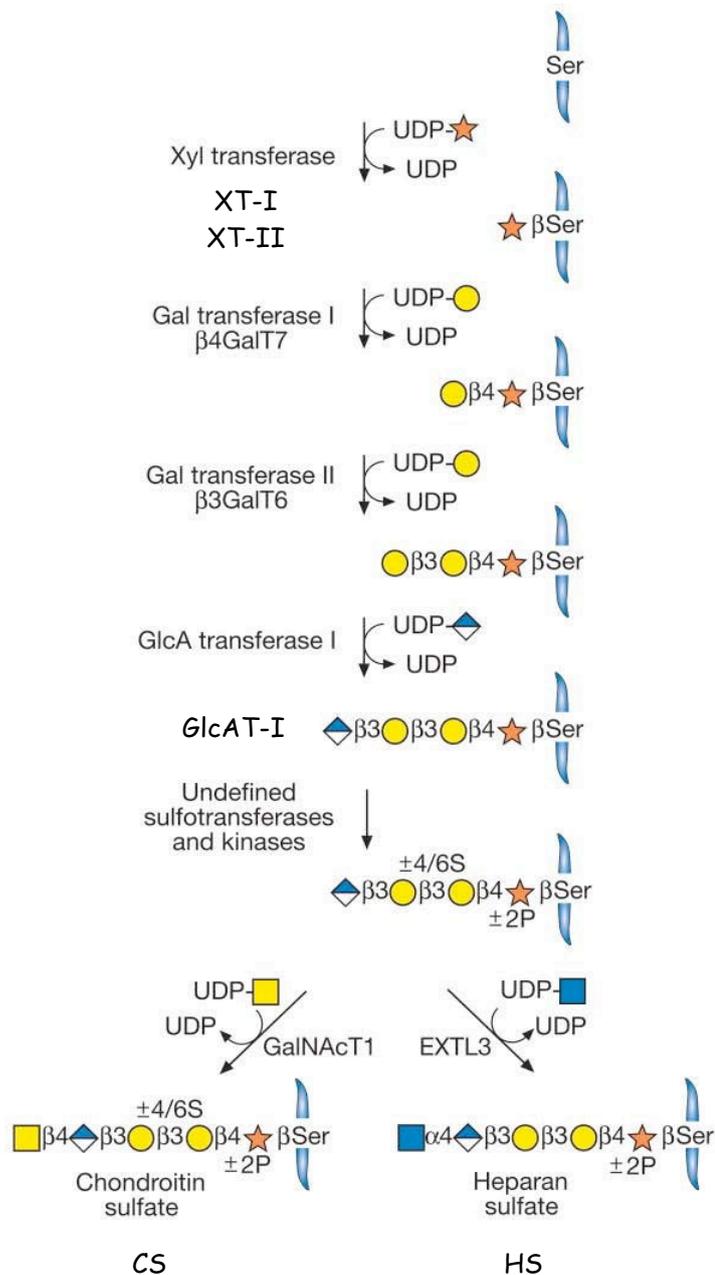


Figure 10 : Assemblage de l'amorce tétrasaccharidique des chaînes de GAG et extension vers les voies de biosynthèse des Hep/HS ou CS/DS

La synthèse de l'amorce tétrasaccharidique [Xyl β 1,4Gal β 1,3Gal β 1,3GlcA] nécessite l'intervention successive de quatre GTs : les XT-I et XT-II, la GalT-I (β 4GalT7), la GalT-II (β 3GalT6) et la GlcAT-I. La XT-I catalyse le transfert d'un Xyl à partir d'un précurseur UDP-Xyl sur le résidu sérine appartenant à un motif Ser-Gly de la région protéique puis l'ajout des deux Gal est assuré par l'action consécutive des deux GalTs et enfin la GlcAT-I vient compléter l'amorce tétrasaccharidique. C'est à partir de cette amorce que seront ensuite polymérisées les deux types chaînes de GAG.

Source: Essentials of Glycobiology, Esko et al., 2009

Au cours de nos travaux, nous nous sommes particulièrement intéressés à la β 4GalT7. En effet, son importance dans l'initiation des voies de biosynthèse des GAGs a été démontrée par l'absence totale de synthèse de chaînes dans des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*, pgsB-618) déficiente en cette enzyme (Esko et al., 1987). De plus, la β 4GalT7 est capable de prendre en charge des substrats exogènes de type xylosidique et d'initier *in vivo* et *in vitro* la biosynthèse des GAGs (Esko et al., 1987).

Enfin, des mutations fonctionnelles de la β 4GalT7 ont été mises en évidence dans des fibroblastes de patients atteints du syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos conduisant à la production décriue et altérée de PGs matriciels (en particulier la décorine). La diminution quantitative de décorine ou l'absence de son unique chaîne de GAG (forme immature) participe aux signes cliniques associés à ce syndrome, notamment un défaut de cicatrisation, une hypermobilité des articulations, une hypertonie musculaire et une hyperlaxité tégumentaire (Quentin et al., 1990).

Du fait de son rôle précoce dans la biosynthèse de PGs et de sa capacité à prendre en charge des substrats exogènes d'intérêt thérapeutique, la β 4GalT7 représente une cible pharmacologique potentielle.

De façon plus large, l'étude des GTs et plus particulièrement de la β 4GalT7, impliquées dans la biosynthèse des PGs ouvre la voie vers de nouvelles thérapies basées sur l'usage de glycomimétiques comme agents thérapeutiques.

Enfin, des travaux réalisés dans notre équipe basés sur la surexpression du gène codant la GlcAT-I dans des cultures primaires de chondrocytes et des explants de cartilage ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de cette enzyme pour contrer les effets délétères de l'interleukine IL-1 β en favorisant la synthèse de PGs (Venkatesan et al., 2004). Cette approche faisant appel à la surexpression de ces enzymes par transfert de gènes pourrait constituer une approche intéressante de bioingénierie tissulaire visant à la réparation du cartilage dans les pathologies articulaires d'origine dégénérative.

I.1.2 La famille des β 1,4-galactosyltransférases (β 4GalT)

I.1.2.1 Caractéristiques fonctionnelles

Les β 4GalTs possèdent de nombreuses propriétés communes. Ce sont des protéines transmembranaires de type II présentant des propriétés caractéristiques des GTs de l'appareil de Golgi. Elles possèdent une extrémité *N*-terminale cytoplasmique courte suivie d'un domaine transmembranaire unique et d'une extrémité *C*-terminale intraluminaire comprenant une région en forme de tige appelée « stem » et le domaine catalytique. Elles utilisent comme

substrat donneur l'UDP- α -D-galactose (UDP-Gal) et forment uniquement des liaisons de type β 1,4 avec les substrats accepteurs. Cette réaction de transfert s'accompagne d'une inversion de configuration du carbone anomérique (C1) du résidu Gal.

Ces enzymes comme la plupart des GTs de structure GT-A, possèdent un motif DXD susceptible d'intervenir dans la liaison de l'ion métallique et du substrat donneur (Gastinel et al., 1999). Leur domaine catalytique comprend quatre cystéines qui sont conservées dans le cas des six premières β 4GalTs, la β 4GalT7 n'en possédant aucune. La famille des β 4GalTs possède des homologies de séquence avec les UDP-*N*-acétylgalactosyltransférases (GalNAcTs). En effet, leur motif (WG(G/R)EDD(D/E)) ainsi que les parties qui bordent ce motif sont similaires au motif (WGGENxE) de dix membres de la famille des GalNAcTs (Amado et al., 1999).

Les β 4GalTs subissent des modifications post-traductionnelles telles que des *N*-glycosylations. Les β 4GalT5 et -T6 sont plus fortement glycosylées au niveau de leur région « stem » (Amado et al., 1999).

Les β 4GalT1, -T2, -T3 et -T4 présentent *in vitro* des propriétés cinétiques et fonctionnelles similaires, bien que leur distribution tissulaire varie en fonction de l'enzyme considérée. Un résumé des propriétés fonctionnelles et des distributions tissulaires des β 4GalTs est présenté dans le Tableau 2. Les β 4GalT1 et -T2 sont capables de synthétiser la *N*-acétyllactosamine au sein des glycolipides et glycoprotéines et possèdent une activité lactose synthase régulée par la présence de l' α -lactalbumine (α -LA). Les β 4GalT3 et -T4 catalysent également la synthèse de *N*-acétyllactosamine mais leur activité n'est pas régulée par l' α -LA. La β 4GalT4 serait impliquée dans la biosynthèse des glycolipides. La fonction de la β 4GalT5 est encore mal connue. La β 4GalT6 qui est présente de façon abondante dans le cerveau, possède une activité lactosylcéramide synthase importante dans la voie de biosynthèse des glycolipides (Nomura et al., 1998).

La β 4GalT7 catalyse la deuxième étape de la biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique et assure le transfert d'un Gal sur le résidu sérine porté par la protéine « core » du PG.

Isoforme	Liaison	Produit formé	Voie de biosynthèse	Localisation tissulaire
$\beta 4\text{GalT1}$	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta-$	<i>N</i> -acétyllactosamine Lactose (α -LA)	Glycolipide Glycoprotéine	ubiquitaire glandes mammaires (+++)
$\beta 4\text{GalT2}$	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta-$	<i>N</i> -acétyllactosamine Lactose (α -LA)	Glycolipide Glycoprotéine	cerveau (fœtus)
$\beta 4\text{GalT3}$	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta-$	<i>N</i> -acétyllactosamine Lactose	Glycolipide Glycoprotéine	ubiquitaire cerveau (fœtus) placenta, testicules, ovaires, pancréas
$\beta 4\text{GalT4}$	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta-$	<i>N</i> -acétyllactosamine Lactose	Glycolipide Glycoprotéine	cerveau (fœtus) placenta (+++), testicules, ovaires, pancréas
$\beta 4\text{GalT5}$	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta-$??	??	ubiquitaire
$\beta 4\text{GalT6}$	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$	Lactosylcéramide	Glycolipide	cerveau
$\beta 4\text{GalT7}$	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Xyl}\beta 1$	disaccharide [Xyl $\beta 1,4\text{Gal}$]	Protéoglycane	ubiquitaire

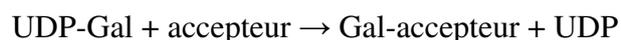
Tableau 2 : Caractéristiques fonctionnelles des $\beta 4\text{GalTs}$

Source: Amado et al., 1999

I.1.2.2 La $\beta 1,4$ -galactosyltransférase 7 ($\beta 4\text{GalT7}$, EC 2.4.1.133)

Caractéristiques enzymatiques

Les GalTs catalysent le transfert du Gal à partir de l'UDP-Gal selon deux configurations anomériques pour former des liaisons de type $\alpha 1-2$, $\alpha 1-3$, $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\beta 1-4$, en présence d'un cation métallique (Mn^{2+}) selon la réaction générale suivante :



Les gènes codant les GalTs sont issus d'un gène ancestral commun et sont le résultat d'un mécanisme de duplication génique puis de divergence (Hennet, 2002).

La $\beta 4\text{GalT7}$ catalyse le transfert du Gal à partir de l'UDP-Gal sur l'hydroxyle en position 4 du Xyl de l'amorce glycopeptidique des GAGs ou celui porté par une aglycone pour former une liaison de type $\beta 1,4$ (Figure 11).

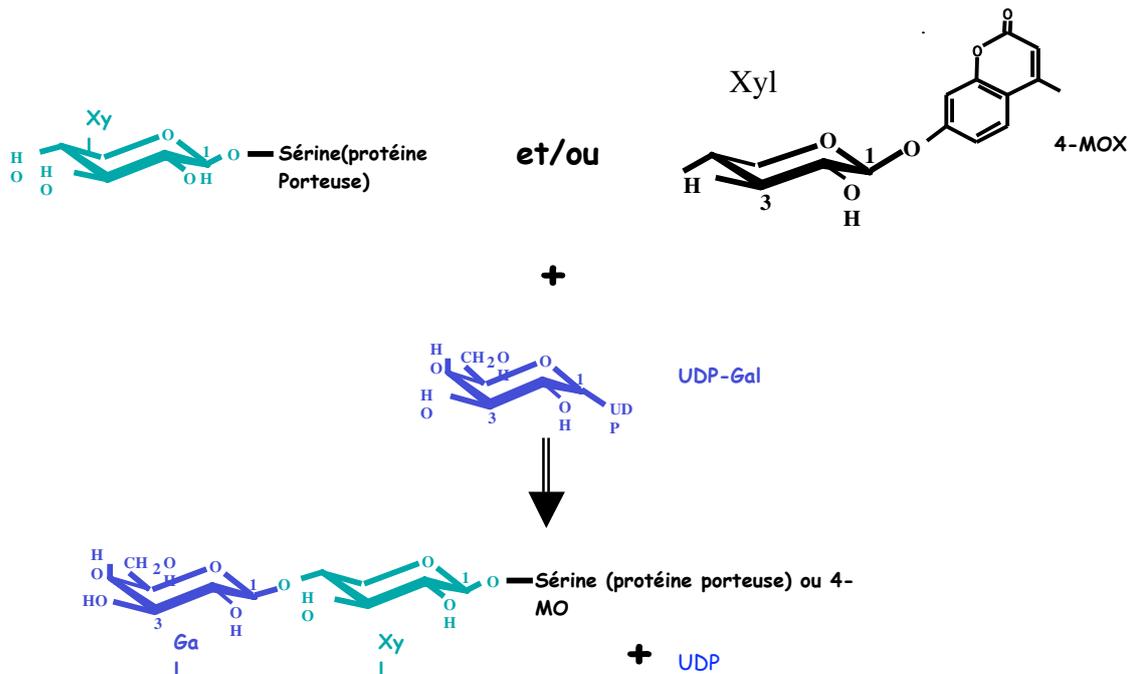


Figure 11 : Réaction catalysée par la $\beta 4\text{GalT7}$

La $\beta 4\text{GalT7}$ catalyse le transfert d'un Gal à partir de l'UDP-Gal sur l'hydroxyle en position 4 du Xyl porté par une sérine (substrat endogène, à gauche) ou par la 4-méthylumbelliférone-7- β -D-xylopyranoside (4-MOX) (substrat exogène, à droite) pour former un disaccharide portant une liaison de type $\beta 1,4$. Cette réaction nécessite la présence de Mn^{2+} .

L'activité de la $\beta 4\text{GalT7}$ a été initialement caractérisée à partir d'homogénats de cellules CHO au moyen de substrats accepteurs xylosidiques liés à une aglycone hydrophobe (Lugemwa et al., 1996). En effet, en présence d'ions métalliques, cette enzyme catalyse efficacement *in vitro* le transfert du Gal sur des molécules xylosidiques portant une aglycone chromogénique telle que la 4-méthylumbelliférone (4-MO), le 4-nitrophényl ou le naphtyl. Il est intéressant de noter que cette réaction s'opère également dans les cellules en culture (Lugemwa et al., 1996) et *in vivo*, permettant l'initiation des chaînes de GAG (Martin et al., 1996). De façon intéressante, les cellules génétiquement déficientes en $\beta 4\text{GalT7}$ sont capables de restaurer une biosynthèse de GAGs par apport de substrat de type xylosidique dans le milieu de culture des cellules (Esko et al., 1987). Ces résultats surprenants indiqueraient éventuellement l'existence d'une autre galactosyltransférase capable de transférer le Gal sur le Xyl porté par le substrat exogène et ainsi initier la biosynthèse des chaînes de GAG.

Caractéristiques moléculaires

L'ADNc codant cette protéine a été cloné à partir des banques d'EST (Expression Sequence Tag) sur la base de son homologie de séquence avec les β 4GalTs (Almeida et al., 1999) et avec la protéine orthologue sqv3 de *C. elegans* (Okajima et al., 1999a). Cet ADNc code une protéine de 327 acides aminés avec une masse moléculaire prédite de 37 kDa contenant un site potentiel de *N*-glycosylation.

La β 4GalT7 se distingue des six autres membres de la famille des β 4GalTs car elle possède deux substitutions, une conservée (D/E) et l'autre non (G/R), au niveau du motif (WGWG(G/R)EDD(D/E)) pour former le motif (WGWGREDDE) (Figure 12). Dotée de six exons, elle possède une organisation génique totalement différente des six autres. Elle présente 30 % d'homologie avec la forme *R10E11.4* de *C. elegans* (forme orthologue). Enfin, la β 4GalT7 est décrite comme impliquée de façon précoce dans la voie de biosynthèse des GAGs. Récemment, l'implication de la β 4GalT4 a été mise en évidence dans la polymérisation des chaînes de KS dans des cultures de cellules épithéliales humaines de cornée (Kitayama et al., 2007).

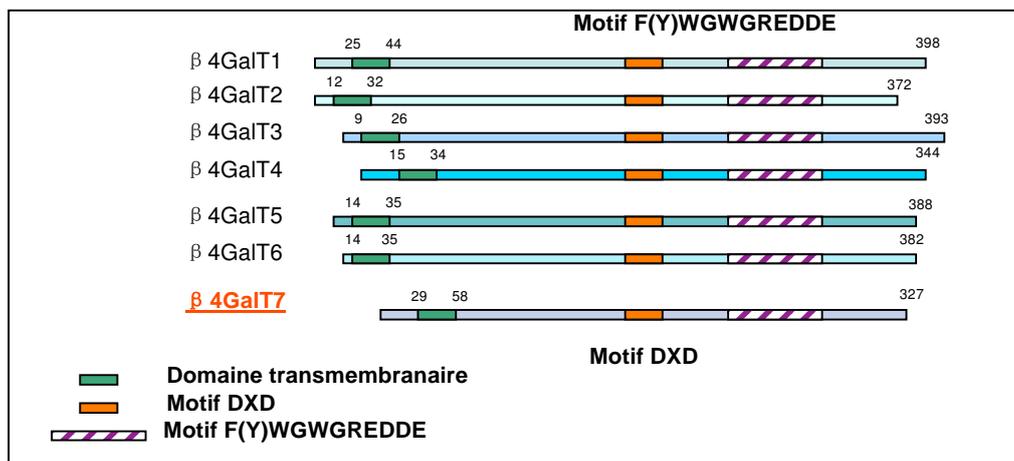


Figure 12 : Schéma des domaines conservés de la famille des β 4GalTs

Les β 4GalTs sont des protéines transmembranaires de type II avec une extrémité *N*-terminale cytoplasmique courte, un domaine transmembranaire et une extrémité *C*-terminale intraluminale comprenant une région en forme de tige appelée « stem ». Elles possèdent deux domaines conservés nommés « DVD » et « F(Y)WGWGREDE » situés au niveau du domaine catalytique de l'enzyme. Le premier motif intervient dans la reconnaissance et la liaison du substrat donneur UDP-Gal en présence du cation Mn^{2+} . Ces deux séquences hautement conservées ont fait l'objet d'études structurales et fonctionnelles qui seront décrites dans ce mémoire.

Source: Amado et al., 1999

I.1.2.3 La β 1,4-galactosyltransférase 1 bovine (β 4GalT1)

La β 4GalT1 est l'isoforme la plus largement étudiée dont seule la structure tridimensionnelle (3D) est élucidée à ce jour (Gastinel et al., 1999). Elle possède deux activités enzymatiques : la première correspond au transfert du Gal à partir d'UDP-Gal sur un résidu GlcNAc alors que la deuxième en présence de l' α -LA, permet la synthèse de lactose (Gal β 1-4Glc) grâce au transfert d'un Gal sur un autre sucre accepteur, le glucose (Glc) (Ramakrishnan et al., 2002). Cette activité tissu-spécifique a lieu exclusivement dans les glandes mammaires au cours de la lactation.

L'élucidation de la structure 3D de la β 4GalT1 bovine met en évidence un repliement de type GT-A comprenant deux domaines Rossmann de type $\alpha/\beta/\alpha$ fortement associés et où les domaines N et C-terminaux lient respectivement les substrats donneur et accepteur (Breton et al., 2006).

La structure comprend onze feuillets β , six hélices α et de deux hélices 3_{10} . Le centre de la structure est composé de huit feuillets β entourés de part et d'autre de deux hélices 3_{10} et de quatre hélices α maintenues par des ponts disulfures. Schématiquement, la topologie de la β 4GalT1 correspond à une poche conique bordée de résidus pour la plupart invariant, qui correspondrait au site de fixation du substrat donneur alors que celui du substrat accepteur serait localisé en périphérie, à proximité du site de fixation de l' α -LA (Ramakrishnan et al., 2001 ; Ramakrishnan et al., 2002).

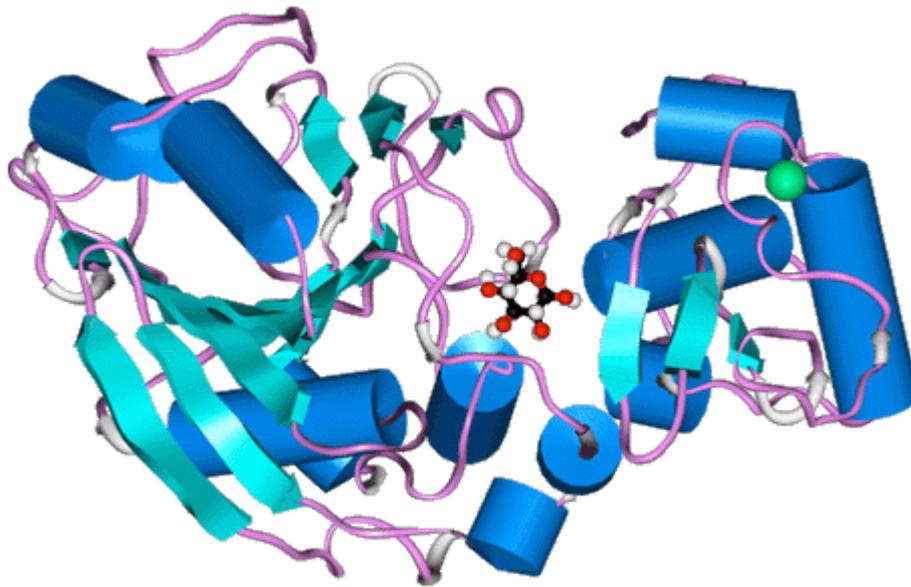


Figure 13 : Structure cristallographique de la β 4GalT1 bovine avec le substrat accepteur (β -D-glucopyranose) lié dans le site actif

Les feuillets β sont représentés par des flèches et les hélices α par des cylindres. Le cofacteur métallique Mn^{2+} est représenté par un rond vert. Le substrat accepteur de l'enzyme est situé dans le site actif.

Source: <http://www.omiconbio.com/Images/lactose-syn.gif> (Ramakrishnan et al., 2001)

I.2 Elongation des chaînes de glycosaminoglycanes

I.2.1 Synthèse des chaînes de galactosaminoglycanes

Après la formation de l'amorce tétrasaccharidique, l'ajout d'un GalNAc (en β 1,4) est catalysé par les CSGalNAcT-1/2 suivi de l'addition successive de chaque résidu saccharidique sous l'action d'enzymes spécifiques. Les *N*-acétylgalactosamine-transférases (GalNAcTs) et glucuronosyltransférases (GlcATs) désignées sous le terme de CS-synthases participent à la voie de biosynthèse des CS/DS en formant le motif disaccharidique [β 1,3GlcA β 1,4GalNAc] (Uyama et al., 2002 ; Sato et al., 2003 ; Gotoh et al., 2002). Les chaînes ayant subi une épimérisation en C5 du GlcA en IdoA participeront à l'édification des chaînes de DS au sein desquelles pourront coexister les deux types de HexA.

I.2.2 Synthèse des chaînes de glucosaminoglycanes

L'ajout de GlcNAc (en α 1,4) catalysé par l'EXTL3 est une étape décisive marquant la bifurcation vers la voie de biosynthèse des HS. Elle sera suivie par l'addition d'un motif disaccharidique [β 1,4GlcA α 1,4GlcNAc] catalysée par les copolymérase (ou exostosines)

EXT1 et EXT2. Au cours de l'élongation, les GlcNAc attachées à l'extrémité de la chaîne seront modifiées par *N*-déacétylation. Cette réaction constitue un événement clé pour les modifications ultérieures des chaînes de HS.

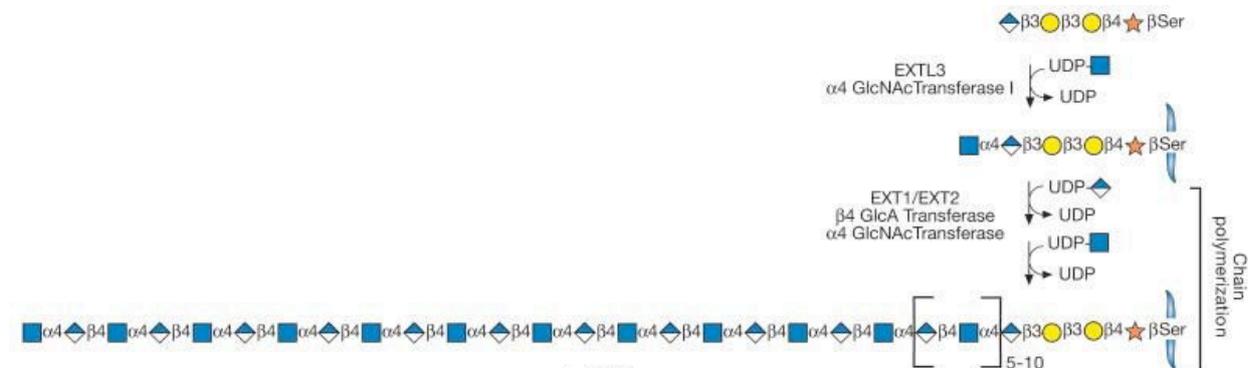


Figure 14 : Extension de l'amorce tétrasaccharidique vers la voie des Hep/HS catalysée par des polymérases EXTL3 et EXT1/EXT2

L'initiation de la polymérisation des chaînes d'Hep/HS est catalysée par l'EXTL3 qui transfère un résidu GlcNAc sur le GlcA terminal de l'amorce tétrasaccharidique. Les GTs EXT1/EXT2 polymérisent les chaînes de Hep/HS en ajoutant alternativement un résidu GlcA et GlcNAc.

Source: Essentials of Glycobiology, Esko et al., 2009

Les exostosines 1 et 2 (EXT1/EXT2)

L'addition du premier GlcNAc au niveau de l'amorce tétrasaccharidique est vraisemblablement catalysée par une enzyme appelée EXTL3 qui diffère des deux transférases EXT1 et EXT2 impliquées dans la polymérisation des chaînes de Hep/HS, comme illustré ci-dessus (Figure 14) (Esko et al., 2009). Les EXT1/EXT2 constituent des enzymes majeures car elles gouvernent la formation des chaînes de Hep/HS.

L'EXT1 et EXT2 sont des protéines transmembranaires de type II comprenant une courte portion *N*-terminale cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un domaine *C*-terminal globulaire. Elles forment *in vivo*, au niveau de l'appareil de Golgi un complexe hétéro-oligomérique actif bifonctionnel doté des deux activités transférasiques : GlcAT et GlcNAcT. L'EXT1 possède quatre motifs DXD conservés (connus pour lier le substrat donneur UDP-sucrose) alors que l'EXT2 n'en présenterait qu'un seul (Zak et al., 2002). Les premier et troisième motifs DXD sont inclus dans des domaines riches en résidus hydrophobes caractéristiques de motifs DXD fonctionnels. De plus, des études récentes sur les

conséquences des mutations touchant l'EXT1 ont montré qu'une mutation dans le premier motif DXD (D164H) abolit l'activité enzymatique. En effet, ce mutant est incapable de restaurer la biosynthèse des HS après transfection du vecteur correspondant dans une lignée déficiente en EXT1 (Zak et al., 2002).

Le domaine impliqué dans l'activité glucuronosyltransférase de l'EXT1 se trouverait situé au niveau de l'extrémité *N*-terminale de la protéine où sont également localisés les deux premiers motifs DXD (Wei et al., 2000). Le siège de l'activité GlcNAcT serait probablement situé au niveau de l'EXT2 ou dépendrait de l'association des deux EXTs sous la forme d'un complexe (Zak et al., 2002). Le rôle de l'EXT2 dans les voies de biosynthèse des HS est décrite comme redondant à celui de l'EXT1. Elle pourrait également être impliquée dans la localisation du complexe au niveau du Golgi (Senay et al., 2000).

Des cellules CHO génétiquement modifiées et déficientes pour les activités GlcNAcT et GlcAT sont spécifiquement incapables de produire des HS alors que la production de CS se trouverait augmentée d'un facteur 3 à 4 (Lidholt et al., 1992). De façon intéressante, seule la réintroduction du gène codant l'EXT1 dans ces cellules déficientes est capable de corriger cette déficience en HS (Wei et al., 2000). De plus, le développement de souris déficientes en cette enzyme a permis de mettre en évidence l'importance du rôle de l'EXT1 dans la biosynthèse des HS et dans les premières étapes de la gastrulation chez la souris (Lin et al., 2000). De manière similaire, des mutations de l'orthologue de l'EXT1 chez la drosophile appelé « tout-velu » provoquent également une absence de biosynthèse de HS et affectent le développement.

De façon complémentaire, des souris génétiquement modifiées pour être déficientes en EXT2 ont été générées afin de mieux comprendre l'étiologie de la maladie des exostoses multiples. Les souris homozygotes *Ext2*^{-/-} présentent un arrêt de la croissance avant le stade de la gastrulation alors que les souris hétérozygotes possèdent un phénotype apparemment normal avec toutefois la présence d'anomalies au niveau de la différenciation du cartilage et la formation d'excroissances osseuses pour un tiers des animaux observés. Ces travaux suggèrent également l'importance du gène *EXT2* dans la synthèse des HS chez la souris (Stickens et al., 2005).

II. LES REACTIONS DE MODIFICATION DE L'AMORCE ET DES UNITES DISACCHARIDIQUES

Les chaînes glycosaminoglycaniques des PGs en cours de synthèse sont modifiées de façon coordonnée en différentes positions des unités osidiques constitutives par une grande variété

de réactions comprenant des phosphorylations, déacétylations, *N*- et *O*-sulfatations et épimérisation.

II.1 Modifications de l'amorce

Phosphorylation en C2 du Xyl de l'amorce

L'amorce tétrasaccharidique est susceptible de subir une phosphorylation en C2 du Xyl à la fois pour les chaînes de CS et DS. Le taux de phosphorylation du Xyl augmenterait de manière graduelle au moment de la formation de l'amorce tétrasaccharidique et serait maximale lorsque l'amorce atteindrait le stade du trisaccharide [Xyl β 1,4Gal β 1,3Gal]. S'en suivrait une rapide déphosphorylation à l'ajout du résidu GlcA de l'amorce. Cependant, le rôle de ce mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation au cours du déroulement de la voie de biosynthèse reste encore à définir.

Des travaux réalisés dans notre équipe ont décrit l'absence totale d'activité de la β 4GalT7 *in vitro* vis-à-vis d'un substrat phosphorylé en C2 sur le Xyl, suggérant que la phosphorylation du Xyl pourrait servir de signal d'arrêt de l'initiation de la biosynthèse des GAGs (Gulberti et al., 2005). D'un autre côté on peut émettre l'hypothèse selon laquelle le phénomène de phosphorylation du Xyl ne se produirait qu'une fois le premier Gal de l'amorce greffé. Il a été également proposé que cette modification fournirait un signal pour l'excrétion des PGs (Prydz et Dalen, 2000). L'ensemble de ces résultats suggère que la phosphorylation du Xyl interviendrait dans la régulation des voies de biosynthèse des GAGs selon des mécanismes qui restent à élucider.

Sulfatation des résidus Gal au niveau de l'amorce

Les événements de sulfatation de l'amorce ne sont observés que pour les chaînes de DS et CS. L'analyse structurale de l'amorce des chaînes glycosaminoglycaniques de PGs extraits de différents tissus notamment de cartilage ont permis d'identifier deux types de sulfatation en position C6 et/ou en C4 des deux résidus Gal de l'amorce des chaînes de CS (Sugahara et al., 1992). Il semblerait que la sulfatation influence le taux de biosynthèse de ces chaînes. Toutefois, ces mécanismes de régulation n'ont pas encore été définis à ce jour.

Des résultats récents indiquent que ces modifications de l'amorce tétrasaccharidique influenceraient de façon significative l'activité de la GlcAT-I. Des travaux de notre équipe sur la GlcAT-I ont démontré que les sulfatations de l'amorce tétrasaccharidique influencent l'activité de la GlcAT-I qui présente un K_m vis-à-vis du substrat Gal β 1,3Gal(6-*O*-sulfate) β 1-*O*-MP six fois inférieur comparé à l'analogue non sulfaté (Gulberti et al., 2005).

De façon complémentaire, des travaux réalisés par Tone et al. (2008) montrent que les substrats synthétiques Ser-*O*-1 β Xyl(2-*O*-phosphate) β 1,4Gal β 1,3Gal et Ser-*O*-1 β Xyl(2-*O*-phosphate) β 1,4Gal(6-*O*-sulfate) β 1,3Gal seraient mieux pris en charge par la GlcAT-I que leurs analogues non modifiés. De plus, le Ser-*O*-1 β Xyl(2-*O*-phosphate) β 1,4Gal β 1,3Gal(6-*O*-sulfate) ne semble pas être un substrat de la GlcAT-I.

Récemment, Kitagawa et al. (2008) ont exprimé et purifié une forme soluble de la chondroïtine 6-sulfotransférase-1 (C6ST-1) à partir de cellules COS-1. Les résultats obtenus montrent que cette enzyme est capable de catalyser *in vitro* la sulfatation en C6 des deux résidus Gal de l'amorce. De façon intéressante, le peptide tétrasaccharidique (Glu-Gly)-Ser-(Gly)-*O*-1 β [Xyl β 1,4Gal β 1,3Gal β 1,3GlcA] est également sulfaté par la C6ST-1 suggérant que la sulfatation des Gal peut se produire avant l'ajout du premier résidu *N*-acétylhexosamine de l'amorce tétrasaccharidique. Enfin, les auteurs ont démontré que la présence d'un Xyl (sous forme d'alditol) seul est insuffisant pour le transfert d'un groupement sulfate sur le second résidu Gal (Kitagawa et al., 2008).

Enfin, il est intéressant de noter que la sulfatation du résidu Gal et la phosphorylation du Xyl constituent deux types de substitutions jamais été identifiées au sein d'une même chaîne. Ceci suggère qu'elles sont mutuellement exclusives, ce qui rend plus encore plus complexe les mécanismes de régulation mis en jeu dans les étapes précoces de biosynthèse des GAGs.

II.2 Modifications des unités disaccharidiques

Les chaînes de GAG en cours de synthèse sont susceptibles d'être modifiées par une batterie d'enzymes : (1) *N*-déacétylation/*N*-sulfatation des unités GlcNAc de l'Hep et des HS; (2) épimérisation du GlcA en IdoA dans les HS et Hep (et DS) ; (3) *O*-sulfatation en différentes positions des unités saccharidiques de Hep/HS et des CS/DS.

II.2.1 Epimérisation des acides uroniques

Les DS diffèrent des CS par la présence d'un IdoA. La formation du premier résidu IdoA favoriserait celle des suivants par la C5 épimérase. La première réaction d'épimérisation serait donc un préalable à la synthèse des DS et empêcherait ainsi celle des HS et CS. L'IdoA peut représenter jusqu'à 100% des résidus d'acide uronique pour une même chaîne de DS.

La C5 épimérase est également responsable de l'épimérisation en IdoA des chaînes de HS.

II.2.2 Sulfatation des résidus composant les chaînes de GAG

Sulfatation des Hep/HS

Elle se fait selon un ordre défini de réactions schématisées-ci-dessous pour aboutir à la formation d'un PG mature (Figure 15a). Dans un premier temps, les résidus GlcNAc sont convertis en *N*-sulfo-D-glucosamine (GlcNS) par des enzymes bifonctionnelles, les *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférases (NDSTs). Quatre isoformes de NDST ont été identifiées et présentent des caractéristiques enzymatiques distinctes qui gouverneraient en partie la proportion de *N*-sulfatation sur les résidus *N*-déacétylés. La C5 épimérase convertirait occasionnellement certains résidus GlcA en IdoA. Dans un second temps, les HS2STs formant un complexe avec la C5-épimérisase modifieraient de façon importante les résidus IdoA et de façon moindre les GlcA. Puis, les HS6STs convertiraient certains résidus GlcN en GlcN 6-*O*-sulfatés. Enfin, la 3-*O*-sulfatation, modification rare des GlcNS et GlcN, est catalysée par les sept membres de la famille des 3-OSTs.

Sulfatation des CS/DS

Les STs impliquées dans la biosynthèse des CS/DS appartiennent à trois familles distinctes et assurent le transfert de groupements sulfates en C4 et/ou C6 des résidus GalNAc et en C2 des HexA. La modification en C4 et en C6 du GalNAc ferait intervenir respectivement trois chondroïtine 4-*O*-sulfotransférases (C4ST1, -2 et -3) et deux chondroïtine 6-*O*-sulfotransférases (C6ST et C6ST2). De façon récente, une ST des DS, la dermatane 4-*O*-sulfotransférase (D4ST1) a été identifiée. Il en est de même pour la galactosaminyl uronyl 2-*O*-sulfotransférase (CS/DS2ST) qui est responsable de la sulfatation en C2 des HexA (Figure 15b).

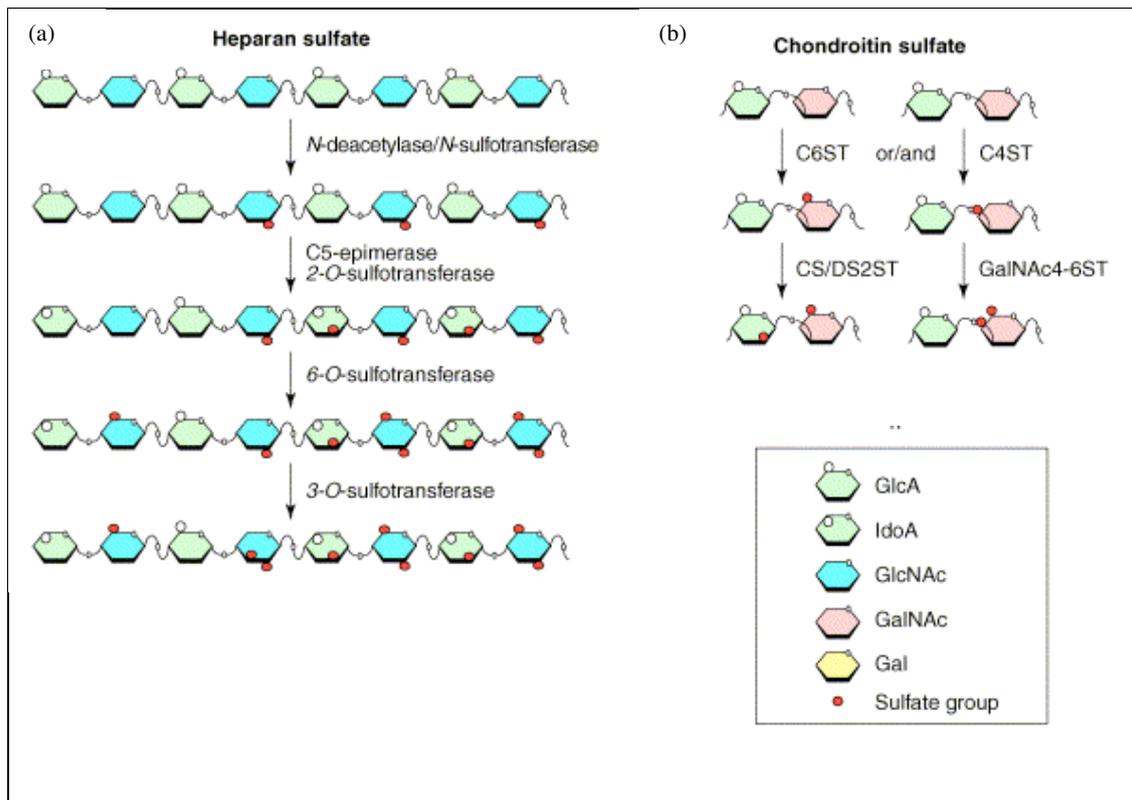


Figure 15 : Modifications des chaînes de HS et CS

(a) Au cours de leur polymérisation, les chaînes de Hep/HS subissent une série de modifications catalysée par quatre familles de STs et une épimérase. Les *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférases assurent la déacétylation des résidus GlcNAc qui est rapidement suivie d'une sulfatation au niveau du groupement amine libre pour former un GlcNS. L'épimérase convertit les résidus GlcA en IdoA qui pourront être sulfatés en position 2 par les HS2STs. Les HS6STs ainsi que les 3-OSTs ajoutent des groupements sulfates au niveau de certains résidus GlcN et/ou GlcNS. (b) Les chaînes de CS/DS subiront également des sulfatations au niveau des positions 4 et 6 du GalNAc et 2 de l'IdoA catalysées par différentes STs. Des épimérisations du GlcA catalysées par la même épimérase que les HS sont également possibles.

Source : Kusche-Gullberg et Kjellen, 2003

***N*-glycosylations**

Les réactions de *N*-glycosylation se produisent au niveau de la région protéique des PGs. La *N*-glycosylation des protéines joue un rôle important au niveau de nombreux processus physiopathologiques (Vercoutter-Edouart et al., 2008). Ces mécanismes complexes ne seront pas détaillés dans ce mémoire.

II.3 Les sulfotransférases à HS

La plupart des STs impliquées dans la biosynthèse des HS ont été identifiées et leur spécificité de substrat étudiée *in vitro* (Kusche-Gullberg et Kjellen, 2003). Leur importance fonctionnelle

et structurale dans la création de sites de liaison aux protéines par interaction avec les chaînes de GAG a été clairement mise en évidence. Des études menées chez la souris, la drosophile ou *C. elegans*, ont montré qu'un dysfonctionnement ou une déficience des STs impliqués dans la synthèse des HS conduisait à une sévère anomalie du développement embryonnaire (Kusche-Gullberg et Kjellen, 2003).

II.3.1 Généralités

La réaction de sulfatation

La sulfation des GAGs a lieu au niveau de l'appareil de Golgi. Les STs assurent le transfert d'un groupement sulfate à partir du donneur universel PAPS (3'phosphoadénosine-5'phosphosulfate) sur la chaîne polysaccharidique en cours de synthèse. Les transporteurs du PAPS sont situés au niveau du RE et de l'appareil de Golgi.

Topologie des STs

Ces enzymes sont des protéines transmembranaires de type II avec un court domaine *N*-terminal cytoplasmique, une région transmembranaire hydrophobe suivie d'une région flexible dite « stem » et d'un domaine catalytique luminal très conservé. Ces enzymes possèdent une région *N*-terminale divergente. Les STs impliquées dans les modifications des HS sont mentionnées dans la Figure 14.

N-sulfatation des HS

La *N*-sulfatation est un phénomène unique aux HS. Les premières réactions de modification de ces chaînes sur les résidus GlcNAc sont catalysées par la famille des NDSTs. Les quatre NDSTs présentent des différences au niveau de leurs propriétés enzymatiques et de leur distribution tissulaire. Ces enzymes ont probablement évolué à partir d'un gène ancestral commun puis ont divergé pour donner naissance à deux sous-familles NDST1/2 et NDST3/4 (Aikawa et Esko, 1999). Chez la souris, les isoformes NSDT1 et NDST2 seraient exprimées de façon abondante et ubiquitaire dans les tissus alors que les NDST3 et NDST4 présenteraient des profils d'expression spécifiques (cerveau). Ces enzymes régissent la densité finale de *N*-sulfatation et la production de quelques rares GlcN (non substituées au niveau du groupement amine) du disaccharide. Toutefois, il a été suggéré que certaines NDSTs initieraient la *N*-déacétylation et la *N*-sulfatation des chaînes de HS alors que d'autres se lieraient à des segments préalablement modifiés afin de poursuivre ou terminer les modifications en cours (Aikawa et Esko, 1999). Ainsi, différentes combinaisons possibles de ces isoformes sont envisagées et expliqueraient les différences observées au niveau des chaînes de HS dans différents types de tissus.

Afin de mieux apprécier le rôle des NDSTs dans la modification des chaînes de HS, l'effet de la surexpression des deux isoformes NDST1 et NDST2 de souris dans des cellules humaines a été analysé. La surexpression de chacune de ces enzymes produit une augmentation du taux de *N*-sulfatation qui s'accompagne d'un allongement de la longueur des chaînes sans pour autant affecter le contenu en IdoA ou en 3-*O*-sulfates (Pikas et al., 2000).

Au contraire, des souris génétiquement modifiées, déficientes en NDST1, présentent une réduction dramatique de leur contenu en *N*-sulfates et en groupements sulfates de façon générale. Cette déficience en NDST1 s'accompagne de troubles respiratoires et d'une forte mortalité néonatale (Ringvall et al., 2000), soulignant l'importance de son rôle dans le développement embryonnaire.

Des études réalisées sur des souris génétiquement déficientes en NDST2 montrent qu'elles seraient incapables de synthétiser de l'Hep sous forme sulfatée. Ces souris sont toutefois viables et fertiles mais présentent au niveau des vésicules des cellules mastocytaires des tissus conjonctifs des quantités réduites d'histamine et de protéases. Ces résultats suggèrent que l'un des sites d'action de l'Hep se situerait au niveau de ces cellules mastocytaires où son absence se traduirait par des sévères anomalies au niveau des granules de sécrétion (Forsberg et al., 1999).

La genèse de souris portant les doubles mutations *NDST1/NDST3* ou *NDST2/NDST3* a permis de mettre en évidence le rôle compensatoire de l'isoforme NDST3 en l'absence de NDST1 (Pallerla et al., 2008).

De façon surprenante, des cellules souches embryonnaires de souris déficientes en NDST1 et NDST2 possèderaient des groupements 6-*O*-sulfates au niveau de leurs chaînes de HS démontrant l'existence d'une 6-*O*-sulfatation sans *N*-sulfatation préalable. Les polysaccharides 6-*O*-sulfatés dépourvus de *N*-sulfates possèderaient des GlcN non substitués (Holmborn et al., 2004).

Les chaînes de HS sont composées alternativement de domaines *N*-sulfatés (NS), de domaines à sulfatation variable (NA/NS) et de domaines *N*-acétylés (NA) (Figure 15). Les régions présentant une forte densité en résidus GlcNS seront préférentiellement modifiées sachant que la *N*-sulfatation semble constituer une substitution préalable aux sulfatations ultérieures (épimérisation et sulfatations en C2 et C6).

***O*-sulfatation des HS**

Il est décrit trois sites de sulfatation possibles, en position C2 des acides uroniques, en C3 et C6 des résidus GlcNH₂ et GlcNS respectivement. Il arrive que la présence de certaines GlcN

N-déacétylées et non substituées contribue ainsi à augmenter la variabilité structurale des chaînes de HS (Tumova et al., 2000). La 3-*O*-sulfatation des GlcNS ferait intervenir au moins six isoformes différentes. Deux séquences saccharidiques dépendent fortement de la 3-*O*-sulfatation : le site de liaison de l'antithrombine et celui pour la protéine d'enveloppe gD du virus de l'herpès. Différents travaux qui seront évoqués dans la suite de ce mémoire suggèrent que la 3-*O*-sulfatation régulerait également d'autres fonctions biologiques importantes.

II.3.2 Spécificité de substrat des enzymes et des interactions protéine-ligand des HS

La spécificité des interactions entre une protéine et une chaîne de HS donnée est gouvernée par le positionnement des groupements sulfates le long de la chaîne polysaccharidique. Ainsi, l'ordre et le positionnement des sulfates génèrent des séquences oligosaccharidiques distinctes auxquelles correspondent des activités biologiques propres. Des interactions de type Van der Waals et hydrophobes seraient également impliquées dans la fixation des ligands protéiques. Les résidus positivement chargés (lysine, arginine ou glutamine) sont fréquemment impliqués dans les liaisons avec les groupements sulfates et les fonctions carboxyliques portés par les HS. La position des acides aminés parfois définie par la structure secondaire de la région protéique des PGs pourrait contrôler les spécificités d'interaction des ligands. De plus, la présence de résidus IdoA au sein des Hep/HS et DS confère une grande flexibilité conformationnelle aux chaînes. Cette liberté d'orientation spatiale leur permet de s'autoassocier et d'interagir avec de multiples molécules extracellulaires et cellulaires à la différence d'autres chaînes de GAG comme l'HA, les CS et les KS.

Ligand		Effets
Enzymes	lipoprotéine lipase	Ancrage de l'enzyme à la surface des cellules, régulation de l'expression de l'enzyme
	antithrombine	Inactivation de la cascade de coagulation
Protéines de la MEC	laminine	Adhésion à la MEC
	fibronectine	Adhésion, formation de l'adhésion focale
Facteurs de croissance et cytokines	FGFs et récepteur des FGFs	Dimérisation, protection contre la dégradation, Stimulation de l'interaction avec les récepteurs à tyrosine kinase
	HGF	Séquestration
	VEGF	
	IL-8	Protection contre la dégradation, séquestration, empêche diffusion
Molécules d'adhésion	N-CAM	Favorise l'adhésion des cellules nerveuses
Protéine virale	glycoprotéine D (HSV)	Attachement du virus HSV-1 à la cellule hôte
Autres	Wnt-1	Signalisation cellulaire

Source: Annual Reviews, Kjellen et Lindahl, 1991

Tableau 3 : Exemples d'interaction entre les PGs à HS et différents ligands protéiques

Exemple du site pentaosidique de fixation de l'Hep à l'antithrombine III

L'antithrombine est un anti-coagulant naturel qui inhibe les protéases à sérine de la cascade de coagulation par la formation d'un complexe stœchiométrique enzyme-antithrombine. La formation de ce complexe est fortement favorisée grâce à l'interaction de l'Hep qui possède un site de liaison à l'antithrombine. Les HS produits par les cellules endothéliales qui bordent les vaisseaux sanguins, présentent également une activité anti-coagulante.

L'antithrombine reconnaît de façon spécifique la structure -Glc(NS ou Ac)**6S**-GlcA-GlcNS**3S**±**6S**-IdoA**2S**-GlcNS**6S**- qui après changement conformationnel, accélère le

processus d'inhibition des protéases à sérine de la cascade de coagulation. La 3-OST1 assure le transfert d'un groupement sulfate sur l'hydroxyle en position 3 du résidu GlcNS du motif disaccharidique [GlcA-GlcNS±6S] situé au niveau de l'extrémité non réductrice du pentasaccharide. Ce groupement 3-*O*-sulfate est indispensable pour induire un changement conformationnel et générer un site de liaison de haute affinité à l'antithrombine III (Lindahl et al., 1983). La spécificité de liaison nécessite également la présence de groupements 6-*O*-sulfates sur les résidus 1 et 5 de la séquence pentaosidique, d'un groupement amine sur le résidu en position 5 et de groupements carboxyliques sur d'autres résidus (Figure 16).

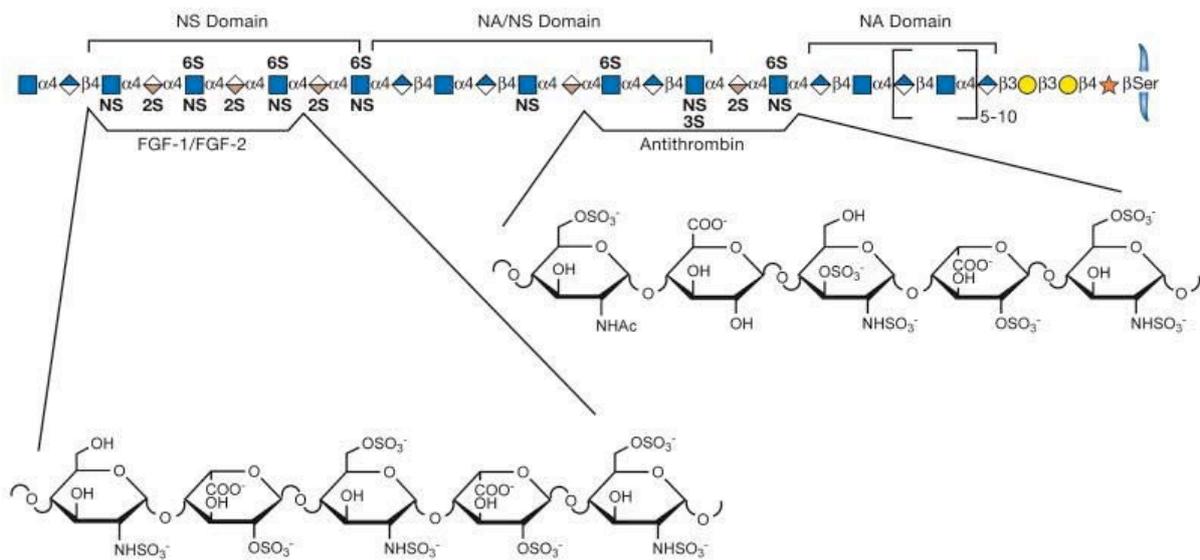


Figure 16 : Exemples de deux domaines de fixation sur les chaînes de HS

Les chaînes de HS consistent en différents domaines qui varient en termes de degré de sulfatation et d'épimérisation. Elles contiennent des domaines *N*-sulfatés (domaines NS), de sulfatation variable (domaines NA/NS) et *N*-acétylés (domaines NA). Ces domaines modifiés représentent des sites de liaison de nombreux ligands comme le FGF-1, le FGF-2 et l'antithrombine.

Source: Essentials of Glycobiology, Esko et al., 2009

Exemple de la glycoprotéine D du virus de l'herpès

L'Herpes simplex virus type I (HSV-1) appartient à la sous-famille des virus à herpès « alpha ». Les infections au HSV-1 ont une forte prévalence chez l'homme et causent des lésions localisées de la peau et des muqueuses. Il est connu que les HS de la surface cellulaire jouent un rôle majeur dans la pénétration du HSV-1, comprenant l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule-hôte. Le processus d'attachement nécessite l'interaction des HS avec la protéine de l'enveloppe gC (glycoprotéine) et/ou gB du virion par le biais de structures saccharidiques sulfatées. Suite à cet attachement, HSV-1 interagit avec la

glycoprotéine gD entraînant la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire qui permet l'entrée du virus dans la cellule-hôte. Trois familles de récepteurs d'entrée du HSV-1 ont été identifiées à la surface des cellules, les récepteurs au TNF et les nectines 1 et 2 de la superfamille des Immunoglobulines (Ig) (Shukla et Spear, 2001). La troisième famille est représentée par une séquence à HS sulfatée en position 3 et située à la surface des cellules est également décrite comme capable de lier la glycoprotéine virale gD. Ce type de récepteur est unique car il s'agit d'un polysaccharide possédant une structure spécifique (Shukla et al., 1999).

La 3-O-sulfatation

Les 3-OSTs comprennent un domaine *N*-terminal divergent et un domaine *C*-terminal conservé. Cette région *C*-terminale est semblable d'une ST à l'autre et constituerait, par conséquent un domaine fonctionnel commun aux STs. Les sept isoformes de 3-*O*-sulfotransférases possèdent des distributions tissulaires différentes et agiraient spécifiquement au niveau de certaines régions le long des chaînes de HS favorisant ainsi la création de diverses structures dotées de fonctions biologiques propres (Yabe et al., 2001).

Comme indiqué précédemment, la 3-*O*-sulfatation des résidus GlcNS constitue un événement rare et représente l'étape finale des modifications des HS. D'autres isoformes catalysant la 3-*O*-sulfatation d'autres résidus saccharidiques ont été identifiées et sont présentées dans le Tableau 4. Ainsi, la 3-OST2 et la 3-OST3A catalyseraient la sulfatation des GlcNS des motifs [HexA2S-GlcNS] et [IdoA2S-GlcNS] respectivement. De même que les 3-OST3A et 3-OST3B catalyseraient la sulfatation des substrats disaccharidiques identiques dont les séquences sont indiquées dans le Tableau 4.

Les trois isoformes 3-OST2, -3 et -4 catalysent la formation de disaccharides tétrasulfatés comme produit majoritaire à partir de l'Hep et des HS alors que la 3-OST5 serait spécifique de l'Hep. Par contre, l'isoforme 3-OST1 produirait des disaccharides tétrasulfatés de façon négligeable (Mochizuki et al., 2008). Après analyse de différents tissus chez le rat, les auteurs ont rapporté une distribution assez large de ce disaccharide avec une prédominance au niveau du foie et de la rate suggérant que les transcrits des 3-OSTs auraient également une distribution tissu-spécifique (Mochizuki et al., 2008). Ce résultat suggère d'autres fonctions de la 3-*O*-sulfatation.

Récemment, Vanpouille et al. (2007) ont démontré que la 3-*O*-sulfatation des GlcN (non substituées) est responsable des interactions des chaînes de HS avec la cyclophiline B, qui est un médiateur de l'inflammation (Vanpouille et al., 2007).

Du point de vue de leurs propriétés biologiques, les HS modifiés par les 3-OST2 et 3-OST3A ne possèdent pas de propriétés anti-coagulantes. Les HS modifiés par les 3-OST2, -3A, -3B, -4 et -6 sont capables de lier la protéine gD et participent ainsi à l'entrée du virus dans la cellule (Liu et al., 1999).

Isoforme	Distribution tissulaire	Substrat	Propriétés biologiques
3-OST1	cœur, cerveau, poumon, rein	-GlcA- GlcNS±6S-	anti-coagulant
3-OST2	cerveau	-HexA2S- GlcNS-	entrée du HSV-1
3-OST3A	cœur, placenta poumons, foie, rein	-IdoA2S- GlcNH₂±6S-	entrée du HSV-1
3-OST3B	cœur, cerveau, poumon, foie, rein	-IdoA2S- GlcNH₂±6S-	entrée du HSV-1 interaction avec CyPB
3-OST4	cerveau	inconnu	entrée du HSV-1
3-OST5	cerveau, moelle épinière, muscle squelettique	-GlcA- GlcNS±6S- -IdoA2S- GlcNS±6S-	anti-coagulant entrée du HSV-1
3-OST6	foie, reins	inconnu	entrée du HSV-1

Tableau 4 : Spécificité de substrat et activité biologique médiée par des isoformes de 3-OST

HexA désigne l'un des deux acides hexuroniques. Les résidus modifiés sont écrits en gras.

Source : Xu et al., 2005

III. IMPLICATION DES ENZYMES PARTICIPANT AUX VOIES DE BIOSYNTHESE ET DE DEGRADATION DES PGs DANS DES SITUATIONS PATHOLOGIQUES

Les PGs étant impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques, nous avons représenté dans le Tableau 5, quelques pathologies d'origine génétique liées à une perturbation de la machinerie enzymatique responsable de la biosynthèse des PGs.

Voies	Enzyme affectée	Pathologie	Déficit biochimique
Biosynthèse	β 4GalT7	syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos	mutations en position A186D, L206P, R270C
	EXT-1, EXT-2	exostoses multiples	biosynthèse en HS défectueuse
Autres	PAPS synthétase 2	dysplasie spondylo-épimétaphysaire	baisse de sulfatation des CS

Tableau 5 : Pathologies d'origine génétique associées à une déficience en GT ou à un transporteur de PAPS

III.1 Expression et déficience génétique de la β 1,4-galactosyltransférase 7

La β 4GalT7 possède un rôle majeur dans la biosynthèse des GAGs, notamment au niveau des petits PGs dans la peau (Almeida et al., 1999). L'analyse de fibroblastes issus de patients atteints du syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos (EDS) montre une forte déficience en activité GalT-I qui catalyse la deuxième étape de la biosynthèse des PGs cellulaires et matriciels. Trois mutations au niveau de la séquence primaire du gène codant la β 4GalT7 ont été identifiées dans des fibroblastes provenant de patients présentant ce syndrome. Les trois mutations A186D, R270C et L206P induisent respectivement une diminution et une perte d'activité de la β 4GalT7 se traduisant par des anomalies qualitatives et quantitatives au niveau des chaînes de GAG des PGs matriciels.

La leucine en position 206 est strictement conservée au sein de toutes les séquences des gènes codant les β 4GalTs et serait adjacente à deux glycines (201 et 202), résidus prédits comme étant inclus dans la poche catalytique de la β 4GalT7. Bien que sa fonction reste encore à élucider, la mutation de ce résidu leucine en proline induit probablement une modification de structure conduisant à une perte totale d'activité de l'enzyme (Okajima et al., 1999b).

L'alanine en position 186 de la β 4GalT7 correspondrait à la sérine en position 274 de la β 4GalT1 bovine, résidu situé dans une région proche du site de liaison de l'UDP-Gal et participerait à la reconnaissance du substrat donneur ou à l'organisation du site actif.

Enfin, la mutation R270C du gène de la β 4GalT7 s'accompagne d'une réduction de l'activité GalT, un défaut de synthèse de décorine et biglycan matures et une réduction de l'épimérisation de la chaîne de GAG de la décorine (Seidler et al., 2006). Une des

conséquences de la diminution de l'activité GalT-I est la sécrétion de décorine dépourvue de son unique chaîne de CS/DS. La décorine déplétée en GAG ne peut plus jouer son rôle dans la fibrillogenèse du collagène. Cette déficience entraîne une désorganisation et une perte de cohésion des tissus conjonctifs conduisant au phénotype suivant : une apparence de vieillissement prématuré, un retard du développement du système musculo-squelettique, un déficit de cicatrisation, des articulations hypermobiles et une distention de la peau (Quentin et al., 1990 ; Okajima et al., 1999a).

De façon intéressante, les symptômes observés dans l'EDS ressemblent fortement à ceux de souris génétiquement modifiées, déficientes en décorine.

III.2 Les *EXT1/EXT2* et implication dans la maladie des exostoses multiples et la cancérogenèse

La maladie des exostoses multiples (HME) est une maladie autosomale dominante caractérisée par la présence d'excroissances osseuses (exostoses ou ostéochondromes) au niveau de l'extrémité des os longs des membres. Occasionnellement, ces exostoses donnent lieu à des complications sévères (compression de nerfs, occlusion de vaisseaux sanguins) qui nécessitent une intervention chirurgicale consistant en l'ablation de ces excroissances.

Trois loci de mutations au niveau des gènes *EXT1*, *EXT2* et *EXT3* ont été identifiés mais la plupart des cas de HME sont attribuées à des mutations non-sens ou un décalage du cadre de lecture de l'*EXT1* ou l'*EXT2* conduisant à un défaut de synthèse de HS. Bien que le lien entre l'absence de biosynthèse de HS et le développement de HME ne soit pas clairement établi, il est probable que l'absence de HS au niveau membranaire aurait des répercussions sur le développement osseux car ces mêmes HS interagissent avec les facteurs de croissance et morphogènes, et leurs récepteurs à la surface des cellules (Lin et al., 2000). Ainsi, des études menées chez la drosophile montrent que l'orthologue du gène *EXT1* appelé « tout-velu » catalyse la polymérisation des chaînes de HS cellulaires impliquées dans la voie de signalisation Hedgehog (Duncan et al., 2001).

De plus, ces deux gènes sont considérés comme des gènes suppresseurs de tumeur car ostéochondromes peuvent se transformer en tumeurs malignes (chondrosarcomes ou ostéosarcomes) (Hennekam, 1991 ; Zak et al., 2002).

III.3 Les enzymes de modification ou de dégradation impliquées dans la cancérogénèse

L'héparanase

L'héparanase ou endo- β -glucuronidase est une enzyme clé impliquée dans la dégradation des HS des MEC et lames basales. Elle est exprimée dans les tissus normaux, le placenta, les cellules immunitaires activées et les kératinocytes. Elle est considérée comme responsable du remodelage des MEC dans le cas de cancers et d'inflammation. Son expression est reliée de façon critique aux processus d'invasion tumorale et métastatique. Elle est également activement impliquée dans l'augmentation de l'expression des facteurs de croissance angiogéniques tels que le VEGF et le bFGF en clivant les chaînes de HS responsables de leur séquestration (Cohen-Kaplan et al., 2008).

L'héparanase agit en libérant des fragments de chaînes de HS de petite taille (5-7 kDa) qui restent capables de moduler la fixation des facteurs de croissance à leurs récepteurs. La découverte d'une élévation du taux d'héparanase dans de nombreuses tumeurs a conduit à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à inhiber son activité. Ainsi, différents types d'inhibiteurs (sucres, molécules de petite taille, anticorps neutralisants) ont été développés et sont actuellement en cours d'études. Seule une molécule oligosaccharidique sulfatée à visée anti-cancéreuse est à ce jour en cours d'essais cliniques (Sanderson, 2001).

Les sulfotransférases

Les STs sont des enzymes clés de la biosynthèse des Hep/HS car elles confèrent aux structures disaccharidiques des fonctions variées en ajoutant des groupements sulfates à différents niveaux. Par exemple, la production de l'Hep est placée sous le contrôle du gène *3-OST1*, enzyme limitante dans le processus de biosynthèse de la structure pentaosidique liant l'antithrombine. L'exploration du rôle *in vivo* de l'Hep et des HS à activité anti-coagulante a été rendue possible par la genèse de souris génétiquement modifiées, déficientes pour le gène *3-OST1*. De façon inattendue, ces souris KO, possèdent des taux d'occlusion et de formation du complexe thrombine-antithrombine comparables aux souris de phénotype sauvage et ne présentent pas de façon évidente de défauts de coagulation. Cependant, elles présentent une mortalité post-natale et un retard de croissance intra-utérine suggérant d'autres rôles physiologiques de la *3-OST1* (HajMohammadi et al., 2003).

De plus, des études menées sur une forme orthologue de la *3-OST3B* humaine chez la drosophile montrent que cette dernière serait impliquée dans la voie de signalisation Notch et de ce fait, affecterait la stabilité ou le cheminement intracellulaire de la protéine Notch vers la surface de la cellule (Kamimura et al., 2004). La protéine Notch consiste en un récepteur

transmembranaire impliqué dans la voie de signalisation Notch. Elle participe à la communication d'une cellule à une autre et à la différenciation cellulaire *via* la liaison de ligands protéiques au niveau extracellulaire.

Enfin, l'extinction du gène codant l'isoforme 3-OST2, par un mécanisme d'hyperméthylation de la région promotrice de ce gène, est observée dans de nombreux cancers en particulier dans des lignées cellulaires issues de cancer du sein (Miyamoto et al., 2003).

Les sulfatases

Chez l'homme, les sulfatases Hsulf-1 et Hsulf-2 seraient capables de moduler les effets de la carcinogénèse *via* la désulfatation des chaînes de HS des PGs des cellules cancéreuses. *Hsulf-1* a été précédemment décrit comme gène suppresseur de tumeur hépatique alors que *Hsulf-2* aurait plutôt des propriétés pro-oncogènes dans les carcinomes hépatocellulaires.

La Hsulf-1 est largement exprimée dans tous les tissus mais serait réprimée dans de nombreuses lignées cancéreuses et des cancers ovariens. Sa répression au sein de ces tissus cancéreux constituerait un nouveau mécanisme par lequel les cellules cancéreuses potentialiseraient, du fait d'une diminution du taux de sulfatation des HS, les voies de signalisation impliquant des facteurs de croissance. La réexpression de cette enzyme dans des lignées cancéreuses ovariennes entraînerait une baisse de l'activation des voies de signalisation dépendante des facteurs de croissance liant l'Hep, une diminution de prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose des cellules traitées par des agents chimiques (Li et al., 2005).

PARTIE 3 : REGULATION DES VOIES DE BIOSYNTHESE DES PROTEOGLYCANES

Comme nous l'avons illustré précédemment, les PGs présents à la surface des cellules ou au sein des MEC influencent de multiples processus cellulaires tels que l'adhésion et la division cellulaires, la coagulation et la lipolyse. Ces phénomènes étant fortement dépendant à la fois de la structure et de la composition de leurs chaînes glycosaminoglycaniques, les PGs occupent des fonctions particulières au niveau de la surface membranaire comparativement aux autres glycoconjugués tels que les glycoprotéines et glycolipides (Esko et Zhang, 1996). De nombreuses études ont été récemment consacrées à la compréhension de la régulation des mécanismes d'assemblage des chaînes de GAG des PGs cellulaires. Toutefois, plusieurs questions ne sont pas encore élucidées, notamment les mécanismes qui régissent les choix du site d'initiation de la chaîne de GAG sur la protéine « core » et les mécanismes d'orientation des voies de biosynthèse vers les HS ou les CS/DS.

Le clonage des GTs impliquées dans la biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique et dans l'élongation des chaînes de GAG, l'étude des mécanismes de régulation de leur expression et leur spécificité de substrat accepteur s'avèrent essentielles afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la biosynthèse des PGs.

I. REGULATION DE L'INITIATION DE LA BIOSYNTHESE DES CHAINES DE GAG AU NIVEAU DE LA PROTEINE « CORE »

I.1 Xylosylation et site d'attachement de la chaîne de GAG

La XT-I et la XT-II initient la formation d'une amorce tétrasaccharidique par transfert du Xyl à partir de l'UDP-Xyl sur un résidu sérine de la protéine porteuse. Il a longtemps été décrit que la xylosylation de la sérine au niveau du site d'attachement des GAGs constitue une étape critique et déterminante pour la formation de la chaîne (Sugahara et Kitagawa, 2000). L'analyse d'une trentaine de séquences clonées codant la protéine « core » des PGs a permis de mettre en évidence un motif Ser-Gly-X-Gly (où X représente n'importe quel autre acide aminé) comme séquence consensus pour la xylosylation. Toutefois, il a été démontré que la mutation du résidu Gly en Ala (alanine) autorise la sécrétion de décorine sous forme de PG mature. Ainsi, des variations de la séquence entourant la sérine sont permises sans perte de la capacité à initier la synthèse des chaînes de GAG (Mann et al., 1990). L'inspection des séquences ayant des sites d'attachement des GAGs révèle qu'au moins deux acides aminés à caractère acide sont toujours présents et situés à proximité des résidus sérine. De manière

générale, la région immédiate entourant le site d'attachement est généralement riche en acide aspartique, acide glutamique, glycine, alanine, sérine, thréonine, phénylalanine, valine et leucine. Enfin, ce site d'initiation des chaînes de GAG serait disposé à la surface de la région protéique du PG permettant ainsi l'élongation des chaînes qui le composent (Esko et Zhang, 1996).

Il semble toutefois que la xylosylation se fasse de manière très variable. Par exemple, le syndécan-1 possède cinq sites potentiels d'initiation mais le nombre de chaînes de GAG varie d'un type cellulaire à l'autre (Bernfield et al., 1992). Cette xylosylation incomplète s'expliquerait soit par la présence d'un faible taux d'UDP-Xyl ou soit par une faible activité enzymatique XylT. On peut également supposer que la faible affinité de la XT pour les sites d'attachement des GAGs engendrerait des xylosylations partielles ou incomplètes conduisant à la production de PGs dits « à temps partiel » car dépourvus de chaînes de GAG (Esko et Zhang, 1996). Enfin, une compétition entre la XT et l' α -GalNAcT pour le même substrat peptidique est également envisageable.

On peut citer parmi ces PGs « à temps partiel » la thrombomoduline, le récepteur de la transferrine et la chaîne invariante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.

I.2 Rôle de la composition de la structure primaire de la protéine « core » dans l'orientation des voies de biosynthèse des PGs

De nombreuses études structurales menées sur la région d'attachement des PGs ont mis en évidence des différences au niveau de leurs régions protéiques suggérant leur éventuelle implication dans la détermination du type de GAG en cours de synthèse. Zhang et al. (1994) ont réalisé des constructions chimériques du betaglycan qui possède deux sites d'initiation des chaînes de GAG en fusion avec la protéine A. Les auteurs ont montré que la sérine en position 535 est capable d'accueillir les deux types de GAG alors que celle en 546 est typiquement dédiée aux CS. L'insertion d'un tryptophane (Trp) à proximité des différents sites d'initiation des chaînes de GAG et plus particulièrement au niveau du site de la sérine en position 546 favoriserait la synthèse de HS. De plus, la longueur des chaînes de HS serait affectée par l'espace entre les domaines formés par une succession de résidus d'acides aminés à caractère acide (de 7 à 9 résidus). Enfin, la présence de résidus à caractère hydrophobe (aromatique et aliphatique) est décrite à proximité des sites d'initiation des HS et constituerait un élément favorable. Ainsi, il a été proposé que la GlcNAcT-I mise en jeu pour l'initiation de ce type de chaîne posséderait un site de reconnaissance de la chaîne oligosaccharidique. Ce site reconnaîtrait le domaine riche en acides aminés acides de la région protéique et comporterait

également une poche hydrophobe capable de fixer le Trp ou une fraction aglycone (Zhang et Esko, 1994).

Enfin, d'autres facteurs tels que la disponibilité en précurseurs (UDP-sucre), leur aptitude à transporter ces précurseurs dans l'appareil de Golgi, et la capacité biosynthétique propre à un type cellulaire vont entrer en jeu dans l'orientation des voies de biosynthèse des HS ou CS.

I.3 Phosphorylation en C2 du Xyl et sulfatation des résidus Gal de l'amorce

La phosphorylation du Xyl est un phénomène observé à la fois sur les chaînes de CS/DS et Hep/HS alors que la sulfatation des Gal de l'amorce ne s'opère que sur les CS/DS (Sugahara et Kitagawa, 2000). La phosphorylation en C2 constitue un événement transitoire suggérant un rôle dans l'adressage des PGs et/ou dans la régulation de l'initiation des chaînes. Par contre, les groupements sulfates présents sur les résidus Gal des chaînes de CS/DS pourraient constituer des signaux de sortie ou d'excrétion spécifiques des CS/DS ou bien des éléments clé qui gouverneraient l'activité des GTs impliquées dans la synthèse de l'amorce. On peut également supposer que ces groupements sulfates inhiberaient la biosynthèse des HS et/ou favoriserait la voie des CS/DS (Kitagawa et al., 1995). Des travaux sont en cours dans notre équipe afin de vérifier ces hypothèses.

Certains substrats phosphatés présentent des affinités différentes comparativement à leur analogue non phosphaté : le trisaccharide [Xyl β 1,4Gal β 1,3Gal] phosphaté est mieux pris en charge par la GlcAT-I recombinante (Sugahara et Kitagawa, 2000). Des travaux réalisés dans notre équipe montrent que la GlcAT-I prend en charge avec une forte affinité un dérivé digalactosidique sulfaté sur la position 4 du 2^{ème} Gal, alors que d'autres dérivés mono ou disulfatés sur les différentes positions du Gal ne sont pas substrats de cette enzyme (Gulberti et al., 2005). Ces travaux renforcent l'hypothèse selon laquelle cette modification joue un rôle important dans la régulation de l'initiation des GAGs.

Kitagawa et al. (1995) ont montré que la sulfatation en position 4 des résidus Gal et du pénultième GalNAc de substrat tétrasaccharidique empêche la prise en charge du PG en cours de synthèse par l' α -N-Acétylgalactosaminyltransférase (α -GalNAcT) alors que la sulfatation en C6 du résidu GalNAc n'a que peu d'effets (Tableau 6) (Kitagawa et al., 1995). Ces résultats ont été confirmés par les travaux de Lidholt et al. (1997) qui ont mis en évidence l'existence d'une liaison de type α (au lieu de β dans les CS) reliant les résidus GlcA et GalNAc. Cependant, les substrats tétrasaccharidiques testés (sulfatés ou non) sont incapables d'initier la biosynthèse des chaînes de HS et de CS dans le système utilisé (microsomes de mastocytes ; Lidholt et al., 1997). Par contre, les auteurs ont détecté une activité GlcNAcT en

présence du substrat hexasaccharide $\alpha\text{Man}\beta 1,4\text{GlcA}-[\alpha 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcA}]_2$ suggérant l'existence d'une deuxième GlcNAcT responsable de l'élongation des chaînes de HS après ajout du premier GlcNAc (Lidholt et al., 1997).

Enfin, la seule ST responsable de la sulfatation des résidus Gal de l'amorce identifiée à ce jour est la C6ST-1 (Kitagawa et al., 2008). La connaissance des autres STs impliquées dans la sulfatation des Gal ainsi que le lieu où se déroulent les modifications restent encore à définir. Il en est de même pour les kinases impliquées dans la phosphorylation du Xyl.

Résidu osidique	Enzyme impliquée	Type GAG modifié	Substrat naturel	Substrat testé	Modification	Conséquences biologiques
1 ^{er} résidu : Xyl	XT-I XT-II	CS/DS et HS	Ser-Gly (ou SG)	analogue peptidique	variation du motif Ser-Gly et acides aminés environnants	production de PGs à temps partiel
2 ^{ème} résidu : Gal	β 4GalT7	CS/DS	Xyl-SG	xyloside xyloside tétrasaccharide sulfaté	phosphorylation en C2 du Xyl absence de protéine « core » sulfatation en C4 du 1 ^{er} Gal	abolition de l'activité β 4GalT7 initiation des chaînes de GAG avec fraction aglycone inhibition de l'activité α -GalNAcT
3 ^{ème} résidu : Gal	β 3GalT6	CS/DS	Gal-Xyl-SG	tétrasaccharide sulfaté	sulfatations en C4 et C6 des deux Gal	inhibition de l'activité GalNAcT
4 ^{ème} résidu : GlcA	GlcAT-I	CS/DS et HS	Gal-Gal-Xyl-SG Gal-Gal-O-MP Gal-Gal-Xyl-SG	trisaccharide phosphaté (Gal-Gal-Xyl)-Ser Digalactoside monosulfaté trisaccharide phosphaté	phosphorylation en C2 du Xyl Sulfatation en C6 du 1 ^{er} Gal Sulfatation en C6 du 2 ^{ème} Gal	meilleure prise en charge du par la GlcAT-I idem abolition de l'activité GlcAT-I
5 ^{ème} résidu : GalNAc ou GlcNAc	α -GalNAcT (I) GlcNAcT-I	CS/DS HS	GlcA-Gal-Gal-Xyl-SG	tétrasaccharide sulfaté tétrasaccharide sulfaté ou non	sulfatation en C4 du 2 ^{ème} Gal	inhibition de l'activité α -GalNAcT inhibition de l'activité GlcNAcT
6 ^{ème} résidu : GalNAc (chaîne)	GalNAcT (II)	CS/DS	GalNAc-GlcA-Gal-Gal-Xyl-SG	hexasaccharides sulfatés	sulfatation en C4 du 1 ^{er} GalNAc	inhibition de l'ajout du 2 ^{ème} GalNAc

Tableau 6 : Modifications des résidus osidiques de l'amorce et des chaînes de GAG et conséquences sur la voie de biosynthèse des GAGs

xyloside phosphaté en C2 :	Xyl(2- <i>O</i> -phosphate) β 1- <i>O</i> -aglycone
digalactoside sulfaté en C4 :	Gal β 1,3Gal(6- <i>O</i> -sulfate) β 1- <i>O</i> -MP
trisaccharide phosphaté :	Gal β 1,3Gal β 1,4Xyl(2- <i>O</i> -phosphate) β 1- <i>O</i> -Ser
tétrasaccharide non sulfaté :	GlcA β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Xyl β 1- <i>O</i> -Ser
tétrasaccharide sulfaté en C4 :	GlcA β 1,3Gal(4- <i>O</i> -sulfate) β 1,3Gal β 1,4Xyl β 1- <i>O</i> -Ser
hexasaccharides sulfatés en C4 :	
	GlcA β 1,3GalNAc(4- <i>O</i> -sulfate) β 1,4GlcA β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Xyl β 1- <i>O</i> -Ser
	GlcA β 1,3GalNAc(4- <i>O</i> -sulfate) β 1,4GlcA β 1,3Gal(4- <i>O</i> -sulfate) β 1,3Gal β 1,4Xyl β 1- <i>O</i> -Ser

I.4 β -D-xyloside et polymérisation des chaînes de GAG

Nous avons évoqué dans la partie précédente de ce mémoire qu'il était possible d'initier la biosynthèse des GAGs par ajout d'un dérivé xylosidique dans le milieu de culture des cellules. Les xylosides initieraient préférentiellement la synthèse de CS/DS alors que la synthèse de chaînes de HS ne se ferait qu'en présence d'une aglycone de structure appropriée. Ceci suggère que la synthèse de CS se ferait par défaut alors que celle des HS nécessiterait un signal apporté par l'aglycone. Il est donc fort probable que des caractéristiques incluses dans la région protéique ou au niveau de l'amorce (sulfatation) soient capables de réguler l'orientation de la synthèse vers les CS ou les HS (Robinson et Lindahl, 1981 ; Stevens et Austen, 1982).

Une α -GalNAcT a été décrite comme une voie annexe à celle des HS et CS et serait responsable de l'accumulation d'oligosaccharides de type GalNAc α 1,4Glc β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Xyl β 1-R dans les cellules cultivées en présence de xylosides. Cette réaction inhabituelle donne naissance à un pentasaccharide qui n'a pas encore été identifié dans les glycoconjugués naturels (Miura et Freeze, 1998).

I.5 Polymorphisme des XTs

Les XT-I et XT-II catalysent une étape qui serait limitante dans la biosynthèse des chaînes de GAG et plus particulièrement, celle des CS (Götting et al., 2007a). La sécrétion simultanée des XTs (par clicage protéolytique) et des PGs au niveau extracellulaire laisse supposer que la détermination de l'activité XT pourrait servir de marqueur biochimique d'une altération du taux de biosynthèse des PGs en situation pathologique (Götting et al., 2007a). Ainsi, des taux plasmatiques élevés de XT ont été trouvés chez des patients souffrant d'arthrose et de polyarthrite rhumatoïde reflétant à la fois la dégradation progressive du tissu cartilagineux et un mécanisme de renouvellement de PGs cellulaires défectueux (Götting et al., 2007b). Récemment, des analyses de polymorphisme ont été réalisées sur les gènes codant les XT-I et

XT-II afin de mettre en évidence des mutations éventuelles de ces gènes qui constitueraient des facteurs de risque dans les pathologies liées aux PGs. Schön et al. (2005) ont réalisé une étude comparative de 49 patients arthrosiques et suggèrent l'implication des polymorphismes des gènes codant chacune des XTs dans les processus d'altération de la MEC au cours l'arthrose. Ainsi, ils ont mis en évidence 25 variants des XT-I et XT-II dans le groupe de patients étudiés et ont relevé plus précisément huit SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) conduisant à des changements de la séquence en acides aminés qui pourraient occasionner des modifications de l'activité XT (Schön et al., 2006). Par exemple, la variation de séquence c.1569C>T du gène *XylT-2* chez des patients jeunes arthrosiques et des malades atteints de façon précoce serait associée à une prédisposition génétique de l'arthrose. Cependant, plus récemment, une étude plus large réalisée sur 1500 personnes a mis en évidence une faible prévalence de ces polymorphismes soulignant ainsi l'importance biologique de ces enzymes. Toutefois, le dosage de l'activité XT dans le sérum pourrait renseigner sur le taux de biosynthèse des PGs et sur l'état physiopathologique de certains patients. On assiste par exemple dans le cas de fibroses à une augmentation de biosynthèse de PGs et de l'activité XT sérique (Götting et al., 2007b).

Enfin, des travaux récemment réalisés dans notre équipe ont mis en évidence le rôle de la XT-I dans la régulation du taux de biosynthèse des PGs lors des processus de dégradation et de réparation du cartilage articulaire dans des modèles d'arthrose expérimentale chez le rat, soulignant son implication dans le maintien de l'homéostasie tissulaire (Venkatesan et al., 2009).

II. VARIATIONS DE LA LONGUEUR DES CHAINES DE GAG

Les enzymes situées à la bifurcation des voies de biosynthèse des GAGs constituent des points importants de contrôle et vont déterminer le type de GAG en cours d'assemblage.

II.1 Effet de l'expression des EXTs sur la longueur d'élongation des chaînes de HS

Les GTs EXT1 et EXT2 forment un complexe hétéro-oligomérique au niveau de l'appareil de Golgi et catalysent l'étape d'élongation de la voie de biosynthèse des HS. Les EXTL présentent également une activité GlcNAcT bien que leur contribution précise dans les voies de biosynthèse des HS n'ait pas encore été clairement déterminée. Le rôle des EXT1, EXT2 et EXTL3 dans l'élongation des chaînes de HS a été étudié à la fois par une stratégie de répression génique *via* l'utilisation de petits ARN interférants ou siRNA (*small interfering*) et par la surexpression des gènes correspondant dans des cellules embryonnaires humaines de

rein 293 (HEK293, Busse et al., 2007). Ainsi, les auteurs ont mis en évidence un effet sur la longueur des chaînes de HS synthétisées après surexpression ou extinction de ces enzymes par transfert de gène. En effet, les cellules dans lesquelles les gènes *EXT1* et *EXT2* sont réprimés synthétisent des chaînes de HS plus courtes alors que la répression de l'expression du gène de l'*EXTL3* produit des chaînes de HS plus longues. Enfin, la surexpression de l'enzyme *EXT1* associée ou non à celle de l'*EXT2* permet d'augmenter de façon significative la longueur de chaîne des HS alors que l'*EXT2* seule n'a que peu d'effets sur la polymérisation. Ces résultats indiquent que la quantité d'enzyme *EXT1* ou de complexe *EXT1/EXT2* influe préférentiellement sur la longueur des chaînes de HS et dans une moindre mesure leur initiation (Busse et al., 2007).

De façon intéressante, des cellules souches embryonnaires déficientes en *NDST1* et *NDST2* et donc en *N*-sulfatation, possèderaient des chaînes de HS plus longues sans que la quantité de HS produites par ces cellules ne soit affectée, suggérant un mécanisme de régulation de l'élongation plus complexe impliquant les STs (Holmborn et al., 2004).

II.2 Sulfatation et transporteurs de PAPS

Le PAPS constitue le donneur universel des ions sulfate et est transporté dans le lumen golgien *via* deux transporteurs spécifiques *PAPST1* et *PAPST2*. Dick et al. (2008) ont montré que l'augmentation de la disponibilité de PAPS dans le lumen de l'appareil de Golgi après surexpression d'un transporteur spécifique favorisait l'augmentation de la sulfatation des CS suivant la voie de sécrétion apicale dans les cellules MDCK II alors que celle des CS du côté basolatéral et des HS ne présenterait que des changements mineurs. Ces données suggèrent donc que la sulfatation des CS suivant la voie apicale est réalisée dans des conditions non optimales, s'expliquant par des valeurs de K_m élevées des STs impliquées ou par une faible concentration en PAPS dans le lumen des voies de sécrétion apicale (comparativement à celles dédiées à la sécrétion basolatérale). Enfin, l'augmentation de sulfatation des CS suivant la voie basolatérale s'accompagne également d'une diminution de la quantité de disaccharides après digestion par la chondroïtinase suggérant une synthèse de chaînes de GAG plus courtes ou une réduction de l'initiation des chaînes de GAG. De façon concordante, l'emploi d'un inhibiteur spécifique des sulfates, le chlorate, permet de diminuer la sulfatation des CS à faible concentration alors que des doses plus fortes affecteraient la sulfatation des HS (Dick et al., 2008).

Récemment, des travaux réalisés par Carlsson et al. (2008) ont démontré que l'activité des *NDSTs* et donc le profil de *N*-sulfatation des HS dépendaient des variations de la

concentration en PAPS dans le lumen du Golgi. Ainsi, une absence en PAPS se traduirait par une *N*-déacétylation aléatoire des résidus GlcNAc alors qu'en présence de ce dernier, les réactions de *N*-déacétylation et *N*-sulfatation agiraient de manière processive générant ainsi de longs fragments *N*-sulfatés au sein des chaînes de HS (Carlsson et al., 2008). Ces résultats suggèrent l'implication de mécanismes de régulation similaires au cours de la biosynthèse de HS dans les cellules eucaryotes. Toutefois, il est intéressant de noter que ces caractéristiques structurales qui sont en majorité définies durant la biosynthèse des HS, peuvent être modifiées sous l'action des endosulfatases nouvellement identifiées.

Comme nous l'avons évoqué auparavant, les mécanismes de modification des chaînes de GAG constituent des événements déterminants la fonctionnalité des PGs.

De nombreuses pathologies décrites dans la littérature mettent en cause le taux de sulfatation des PGs soit par un défaut de transport de PAPS comme dans le cas de la dysplasie humaine spondylo-épimétaphysaire ou soit par une répression des certains gènes codant les STs dans de nombreux cancers *via* un mécanisme de méthylation de l'ADN (Miyamoto et al., 2003). De plus, l'expression de la Hsulf-1 serait réprimée dans de nombreuses lignées cancéreuses et sa réexpression ralentirait la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion (Lai et al., 2008). Les mécanismes épigénétiques et leur implication potentielle dans la régulation des voies de biosynthèse des PGs et plus particulièrement des HS feront l'objet de ce dernier chapitre.

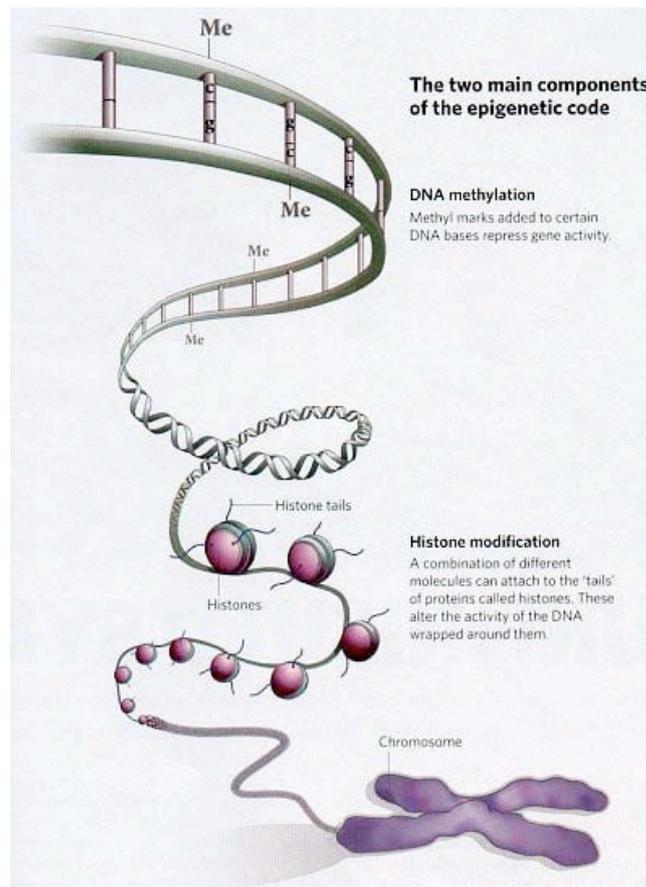
III. LES MECANISMES EPIGENETIQUES

Les mécanismes épigénétiques sont responsables de la régulation de la structure de la chromatine selon un processus complexe et dynamique. Ce dernier est modulé à différents niveaux et fait intervenir de nombreux mécanismes dont la méthylation de l'ADN, le remodelage des nucléosomes, les modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation) (Figure 17). Parmi ces mécanismes, nous nous focaliserons sur le processus de méthylation de l'ADN. On estime qu'environ 70% des sites CpG dans le génome des mammifères sont méthylés de façon constitutive. Ainsi, ce mécanisme courant de régulation est impliqué notamment dans l'inactivation du chromosome X chez la femme mais aussi l'expression spécifique des allèles ou encore la stabilité du génome (Ducasse et Brown, 2006). Initialement considéré comme un mécanisme de protection pour limiter l'expression des ADN étrangers, la méthylation de l'ADN est reconnue désormais comme essentielle au bon fonctionnement des cellules.

Cependant, au cours de nombreux cancers, ces modifications épigénétiques sont mises en cause dans la modification de l'expression des gènes par répression ou activation des gènes. De récentes publications tendent à démontrer que ces mécanismes seraient également impliqués dans différentes pathologies notamment d'origine dégénérative telles que l'arthrose. En effet, il a été montré que les gènes codant les enzymes responsables de la dégradation du cartilage et de sa composante matricielle (agrécánases, métalloprotéases telles que MMP-13, -9, -3) présenteraient également des changements des profils de méthylation au niveau des régions promotrices de ces derniers (Roach et al., 2005).

III.1 Définition et mécanismes

Ces modifications sont confinées à des tissus ou à des cellules spécifiques d'un tissu et sont transmises de façon stable aux cellules-filles durant la mitose (Roach et Aigner, 2007). Certains gènes présentent au niveau des régions promotrices et de leur premier exon des îlots CpG *i.e* des régions riches en nucléotides cytosine-phospho-guanine (CpG) capables de réguler l'expression des gènes *via* des mécanismes jouant notamment sur l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. Ces modifications épigénétiques ont la particularité de ne pas altérer irréversiblement la séquence nucléotidique de l'ADN.



**Figure 17 : Exemples de deux mécanismes épigénétiques :
la méthylation de l'ADN et les modifications des histones**

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur le noyau pyrimidique des cytosines et conduit à une répression du gène méthylé. Une série de modifications (acétylation, méthylation et phosphorylation) peuvent également affecter les protéines liées à l'ADN ou histones. Ces réactions ont pour conséquence de modifier la structure de l'ADN et d'induire des changements d'expression des gènes correspondants.

Source : embryology.med.unsw.edu.au/.../epigenetics.jpg

III.1.1 Réaction

La méthylation consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur le cycle pyrimidique des cytosines situées en 5' d'une guanine. Les enzymes qui catalysent la réaction de méthylation de l'ADN sont des méthyltransférases ou DNMTs. Elles assurent ainsi le transfert d'un groupement méthyle provenant du donneur *S*-adenosyl-méthionine (SAM) sur la base de la cytosine. Les acides foliques et la choline sont les principaux donneurs de méthyle dans l'organisme.

III.1.2 Modification des histones et méthylation de l'ADN

De nombreuses DNMTs ont été identifiées dont la DNMT-1 qui est responsable entre autre, du maintien du profil de méthylation des gènes au cours de la division cellulaire (Roach et Aigner, 2007).

Les histones sont sujettes à des modifications post-traductionnelles au niveau de leur extrémité *N*-terminale telles que des acétylations, méthylations, phosphorylations, polyADP-ribosylations et ubiquitinations. Les mécanismes d'acétylation et de déacétylation des histones influencent l'accessibilité de l'ADN à des facteurs de régulation au cours de la réplication, la réparation de l'ADN et la transcription des gènes.

Une hyperméthylation de l'ADN ou une hypoacétylation des histones sont souvent associées à une répression des gènes correspondants alors qu'une hypométhylation de l'ADN et une acétylation des histones permettraient l'activation transcriptionnelle des gènes régulés. Le répresseur transcriptionnel MeCP2 qui appartient à la famille de protéines « *Methyl-CpG binding proteins* » peut venir se fixer au niveau de sites CpG méthylés et recrutera à son tour les histones déacétylases (HDACs). La fixation au niveau des CpG méthylés de MeCP2 et de MBD2 qui est à une enzyme déméthylante entraînera l'inactivation de la transcription du gène (Ng et al., 1999). Sous l'action des HDACs et des méthyltransférases des histones (HMTs), la chromatine sera localement condensée rendant par conséquent la transcription impossible.

De plus, une hypométhylation des îlots CpG peut conduire à l'activation d'un gène suivie d'une expression anormale de ce dernier (Attwood et al., 2002).

Les allèles des gènes parentaux peuvent être méthylés de façon différente permettant ainsi l'expression d'un allèle unique alors qu'une méthylation anormale des régions régulatrices peut causer soit une expression biallélique, soit une absence d'expression du gène.

III.2 Epigénétisme et pathologies

De nombreux désordres physiopathologiques liés à l'âge mais aussi les cancers, les maladies auto-immunes et neurodégénératives mettent en cause une méthylation aberrante de l'ADN au niveau des régions promotrices des gènes et/ou une acétylation des histones.

Avec l'âge, on assiste à une hypométhylation globale favorisant une instabilité génomique due à une diminution de la DNMT1 et la surexpression de proto-oncogènes (Burzynski, 2005 ; Zhang et al., 2002). La surexpression d'endoglycosidases responsables de la dégradation de la MEC telles que l'héparanase est fréquemment rencontrée dans les tumeurs malignes et favorise la progression des métastases. Des études menées par Ogishima et al. (2005) ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de l'héparanase dans des

cancers de la vessie provenant de l'effet combiné de l'hypométhylation de la région promotrice du gène codant l'héparanase et d'une meilleure fixation du facteur EGR1 (*Early Growth Response*) au niveau de la région proximale non méthylée du gène.

A l'inverse, une hyperméthylation aberrante au niveau d'un îlot CpG d'une région promotrice peut induire la répression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la résistance aux médicaments, la différenciation, l'angiogénèse... Les conséquences d'une hyperméthylation d'un gène seront d'autant plus importantes qu'elles concerneront des gènes suppresseurs de tumeur.

Par exemple, l'*EXT1* qui est considéré comme un gène suppresseur de tumeur, serait éteint dans plusieurs lignées cancéreuses humaines (leucémies et cancer de la peau de type non-mélanome). Ce phénomène serait dû à une répression au niveau transcriptionnel du gène causée par une hyperméthylation de sa région promotrice (Ropero et al., 2004). L'absence d'expression de ce gène est à l'origine d'une déficience de synthèse des HS dans les cellules cancéreuses étudiées. La levée de la répression du gène *EXT1* par traitement avec un agent inhibiteur des méthyltransférases, le 5-aza-2'-déoxycytidine (5-Aza-dc) a permis de restaurer la synthèse des PGs à HS. Cette restauration s'accompagne également d'une diminution de la formation de colonies cancéreuses sur une matrice de méthylcellulose. *In vivo*, on assiste également à une croissance tumorale ralentie dans un modèle de xénogreffe de souris « nude ». Ces résultats soulignent l'importance et l'impact de la déficience en HS dans les processus de cancérogenèse et mettent en évidence les effets cellulaires d'une hyperméthylation du gène *EXT1* et son rôle dans l'installation et la progression tumorale (Ropero et al., 2004).

D'autres gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des HS seraient également hyperméthylés au niveau de leur région promotrice. Ainsi, la région promotrice du gène *3-OST2* a été démontrée comme étant hyperméthylée dans de nombreux cancers (Miyamoto et al., 2003). L'analyse des profils de méthylation de ce gène dans des lignées cellulaires de cancer du sein a permis de mettre en évidence une répression de ce dernier qui est rétablie après traitement des cellules par la 5-Aza-dc.

III.3 Epigénétisme et thérapie, diagnostic et pronostic

Du fait de leur caractère réversible, les modifications épigénétiques peuvent faire l'objet de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il est possible par un régime déficient en donneur de méthyle (acide folique, méthionine, choline) d'induire une hypométhylation de l'ADN. En effet, l'acide folique étant un cofacteur nécessaire à la synthèse du précurseur SAM, son absence entraîne à une accumulation de SAH (*S*-adénosylhomocystéine) qui est également un

puissant inhibiteur des DNMTs. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs nucléosidiques ou non nucléosidiques des DNMTs ou des oligonucléotides anti-sens dirigés contre les DNMTs permet une inhibition de la méthylation de l'ADN à visée thérapeutique (Lu et al., 2006).

Les inhibiteurs nucléosidiques sont des dérivés de la déoxycytidine avec une modification au niveau de la 5^{ème} position du noyau pyrimidique : 5-azacytidine (azacitidine), 5-aza-2'-déoxycytidine (Décitabine ou 5-Aza-dc) et Zébularine [1-(beta-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-Z-one]. Ces composés sont convertis en désoxynucléotides triphosphates puis incorporés au cours de la réplication de l'ADN à la place des cytosines. Ils inhibent de façon irréversible les DNMTs en formant une liaison covalente entre les méthyltransférases et l'ADN qui aura incorporé ces analogues. L'ADN se trouvera alors déméthylé de façon stable (Zhou et al., 2002). En inhibant les DNMTs, ils permettent à faible dose une réactivation des gènes éteints mais à fortes doses peuvent induire une cytotoxicité (Lu et al., 2006).

L'azacitidine est le premier agent hypométhylant de l'ADN approuvé par la « *Food and Drug Administration* » ou FDA dans le traitement des syndromes myélodysplasiques et est testé en phase III dans celui d'autres sous-types de syndromes myélodysplasiques. De même que la décitabine stimule très efficacement la production d'hémoglobine fœtale (HdF) pour le traitement de patients souffrant de pathologies de l'hémoglobine et de thalassémies. Toutefois, leur utilisation est limitée du fait de réactions secondaires (au niveau du tractus gastro-intestinal, neutropénie, baisse de thrombocytes) et leur voie d'administration (injection).

Comme nous l'avons précisé antérieurement, les phénomènes d'hyperméthylation sont souvent associés à la déacétylation des histones lors de la répression de certains gènes au cours de situations pathologiques. Il est également possible d'inhiber de manière globale ou plus spécifique les HDAC en utilisant différentes petites molécules (hydroxamate, peptides cycliques, acides aliphatiques, la trichostatine A...).

De part leur caractère réversible, les modifications épigénétiques présentent des perspectives encourageantes pour le développement de thérapies expérimentales ciblant à la fois la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones. L'usage des agents déméthylants présentant parfois des problèmes de cytotoxicité, le développement d'approches plus spécifiques comme les oligonucléotides anti-sens ciblant spécifiquement les méthyltransférases de l'ADN est présentement envisagé.

En clinique, la méthylation aberrante de l'ADN plasmatique ou sérique est maintenant utilisée dans le diagnostic de nombreux cancers. Par exemple, une hyperméthylation du promoteur du gène *p14ARF* qui est un gène suppresseur de tumeur, et est également impliqué dans la

régulation du cycle cellulaire, a été mise en cause dans les cancers de la vessie, suggérant que les ADNs présents dans le plasma jouent le rôle de marqueurs potentiels pour le diagnostic dans ce type de cancer (Dominguez et al., 2002 ; Garcia et al., 2008).

Les progrès techniques de la biologie moléculaire ont permis l'identification d'acides nucléiques dérivés de tumeurs présents dans le plasma des patients atteints d'un cancer. Le dosage des ADN plasmatiques présente de nombreux avantages car c'est une méthode de diagnostic non invasive et permet la collecte d'échantillons d'un même patient durant un traitement pour un meilleur suivi thérapeutique (Paci et al., 2009).

Bien que les mécanismes par lesquels ces acides nucléiques sont libérés dans le plasma ne soient pas élucidés, il a été suggéré que les altérations présentes dans l'ADN plasmatique des patients malades pourraient servir de facteur pour le diagnostic ou détecter de façon précoce les tumeurs malignes.

Présentation de l'étude

La compréhension des mécanismes de biosynthèse et de modification des GAGs représente un enjeu médical majeur. En effet, ces macromolécules polysaccharidiques possèdent des fonctions biologiques hautement diversifiées car elles assurent à la fois un rôle structural et sont également capables de réguler l'activité biologique de nombreux médiateurs solubles. Bien que la plupart des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des PGs soit identifiée, de nombreux efforts restent à fournir pour aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu. En effet, la biosynthèse des GAGs fait intervenir une machinerie enzymatique complexe comprenant des GTs, des STs, des sulfatases, des kinases et phosphorylases assurant l'hétérogénéité structurale et fonctionnelle des chaînes de GAG des PGs. Des anomalies de synthèse des PGs ou une perturbation de cette machinerie enzymatique peuvent être à l'origine de nombreux désordres, tel que le syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos qui résulte d'une déficience génétique de la β 4GalT7, enzyme essentielle à la formation de l'amorce tétrasaccharidique (Götte et Kresse, 2005).

Dans ce contexte, notre équipe a mis en place une approche pluridisciplinaire visant à explorer les systèmes enzymatiques et à comprendre les mécanismes de régulation des voies de biosynthèse des PGs. Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur une enzyme qui intervient de façon précoce dans la biosynthèse des GAGs, la β 4GalT7. Il a été démontré que cette enzyme est capable d'initier *in vitro* et *in vivo* la biosynthèse des chaînes de GAG à partir de molécules comportant un résidu Xyl couplé à une aglycone hydrophobe. Cette propriété permet d'envisager la conception de molécules chimiques ou de glycomimétiques capables d'interférer, contrecarrer, suppléer des défaillances de la machinerie enzymatique et offre des perspectives encourageantes dans le traitement des pathologies liées à une altération des PGs.

Une partie de mon travail a donc consisté en la réalisation d'études structurales et fonctionnelles de la β 4GalT7 par une approche de mutagenèse dirigée basée sur l'alignement de séquences des membres de la famille des β 4GalTs identifiées par analyse phylogénétique¹. Conjointement, les données de la β 4GalT1 bovine qui représente la seule structure de β 4GalT élucidée à ce jour, ont permis le développement d'un modèle moléculaire de l'organisation du site actif de la β 4GalT7². Les indications fournies par ce modèle de la β 4GalT7 et l'analyse phylogénétique ont permis l'identification de deux domaines hautement conservés au sein des

¹ Les analyses phylogénétiques sont réalisées en collaboration avec l'équipe de Rafaël Oriol.

² Les travaux de modélisation moléculaire sont réalisés en collaboration avec Guillermo Mulliert.

sept β 4GalTs humaines et de la sous-famille des β 4GalT7 appartenant à différentes espèces. Le premier motif est la séquence « signature » D¹⁶³VD¹⁶⁵, communément connue pour être impliquée dans les interactions avec le substrat donneur *via* la coordination du cation Mn²⁺. Le deuxième motif consiste en la séquence ²²¹FWGWGREDDE²³⁰, qui a également fait l'objet d'une étude *in vitro* en vue de déterminer quels résidus participaient à l'organisation du site actif de l'enzyme. De façon complémentaire, nous avons évalué les conséquences *ex vivo* de l'introduction d'une β 4GalT7 mutée sur les taux de biosynthèse des PGs par incorporation de ³⁵S dans des cultures de cellules déficientes en β 4GalT7. Nous avons également quantifié les capacités d'initiation des chaînes de GAG de l'enzyme sauvage et des mutants au moyen de deux substrats capables de mimer l'amorce glycopeptidique endogène (Publication n°3, Talhaoui I. et al., en préparation).

Cette partie du travail a pour objectif d'établir des bases moléculaires vers le développement de molécules destinées au traitement de pathologies associées à une perturbation de la synthèse des GAGs notamment dans les atteintes articulaires d'origine dégénérative.

Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre quels sont les mécanismes susceptibles de réguler les voies de biosynthèse des PGs. Nous avons ainsi entrepris une approche originale basée sur l'implication potentielle d'une modification épigénétique dans la régulation des voies de biosynthèse des PGs. En effet, de récentes publications ont reporté (1) l'implication potentielle d'une régulation par méthylation de l'ADN des métalloprotéases impliquées dans l'arthrose (Roach et al., 2005), (2) des événements épigénétiques contribuant à la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde (Strietholt et al., 2008) et (3) une diminution de l'expression de l'EXT1 dans les chondrosarcomes et les ostéosarcomes (Hameetman et al., 2007).

Au cours de notre travail, nous avons choisi en premier lieu, comme modèle d'étude, la lignée de chondrosarcome humain H-EMC-SS (HEMC) qui constitue une lignée tumorale invasive du tissu conjonctif. Nous avons débuté notre travail par une analyse bioinformatique de la région promotrice proximale et du premier exon des gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des PGs afin de mettre en évidence les régions riches en CpG susceptibles de présenter une méthylation aberrante de l'ADN, événement souvent mis en cause au cours du processus tumoral. Nous avons utilisé comme stratégie, la méthode de conversion au bisulfite de l'ADN génomique afin d'identifier les gènes hyperméthylés dans les cellules HEMC. Ainsi, l'analyse des profils de méthylation des quatre GTs et de l'EXT1 impliquées dans les premières étapes de synthèse nous permet d'avancer que ce mécanisme épigénétique

n'entre pas en jeu dans la régulation de l'expression de ces gènes. De façon intéressante, après établissement de cartes de méthylation des gènes d'intérêt, nous avons retenu les gènes impliqués dans les *N*- et *O*-sulfatations des HS comme potentiellement soumis à un mécanisme épigénétique *via* la méthylation de l'ADN. Suite à ces résultats, nous avons évalué par analyse semi-quantitative l'expression des transcrits codant la NDST1, la HS2ST1, les HS6STs et les 3-OSTs dont l'expression était susceptible d'être éteinte par hyperméthylation en traitant les cellules HEMC par un agent inhibiteur des DNMTs, la 5-Aza-dc. Le rôle d'une hyperméthylation dans la régulation de l'expression de ces gènes a été confirmé d'une part par l'induction de l'expression des transcrits NDST1, HS6ST2, 3-OST1, -2, et -3A dans les cellules HEMC traitées et d'autre part, par une baisse du taux de méthylation de l'ADN génomique correspondant aux gènes *NDST1*, *HS6ST2* et *3-OST3A*. De façon précise, l'analyse du profil de méthylation des gènes codant les 3-OSTs a permis d'identifier une hyperméthylation des gènes *3-OST1* et *3-OST3A* au niveau de leur région promotrice, qui semble être caractéristique de la lignée cellulaire HEMC. Le clonage de ces deux enzymes dans la suite de nos travaux a permis de mesurer l'impact de leur surexpression à la fois sur le taux de sulfatation des chaînes de HS et sur le comportement des cellules HEMC. Par cette approche, nous avons pu comparé les résultats obtenus après traitement à la 5-Aza-dc à ceux obtenus pour les cellules transfectées.

Nous avons ensuite poursuivi notre étude par une évaluation des conséquences d'une baisse ou d'une augmentation d'expression des gènes hyperméthylés par analyse biochimique des PGs cellulaires et par des tests cellulaires de prolifération, d'adhésion et de migration. L'analyse du contenu en PGs des cellules HEMC avant et après traitement à la 5-Aza-dc a été réalisée par deux techniques chromatographiques afin d'apprécier la charge globale des PGs par chromatographie échangeuse d'anions d'une part, et la longueur des chaînes de GAGs par chromatographie d'encombrement stérique d'autre part. Ainsi, nous avons montré que la 5-Aza-dc est capable de corriger les altérations observées au niveau des HS cellulaires par induction de l'expression des STs responsables de leur modification. Nous avons démontré que les changements occasionnés concernent principalement le taux de sulfatation des chaînes de HS. Les analyses en immunofluorescence au moyen d'anticorps anti-HS sur des cellules traitées nous ont permis de conforter ces résultats. Enfin, nous avons entrepris des transfections transitoires des cellules HEMC avec les vecteurs plasmidiques codant les 3-OST1 et 3-OST3A afin de déterminer leur implication dans la hausse de sulfatation des HS cellulaires observée après traitement à la 5-Aza-dc. Ainsi, nous avons pu mettre en cause de façon précise l'effet de l'expression des gènes *3-OST1* et *3-OST3A* sur le taux de sulfatation

des HS et sur le comportement cellulaire de la lignée de chondrosarcome HEMC. Nous soulignons l'importance de la modification catalysée par la 3-OST3A dans le comportement invasif des cellules de chondrosarcome HEMC (Publication n°1, Bui C. et al., sous presse).

Ayant mis en évidence l'importance des 3-OST1 et -3A responsables de la sulfatation en position 3 des résidus de GlcNS, nous avons dans une approche comparable à celle mise en œuvre pour les cellules HEMC, également établi les cartographies de méthylation des gènes de la sous-famille des 3-OSTs dans les cellules d'adénocarcinome du sein MCF7. Nous avons ainsi identifié une méthylation aberrante des gènes *3-OST2*, *3-OST3A* au niveau des régions promotrices de ces gènes et une méthylation modérée du gène *3-OST1* dans ces cellules. Enfin, nous avons constaté une forte diminution de la prolifération cellulaire des cellules transfectées par les plasmides pcDNA-3OST1HA et pcDNA-3OST3AHA. Ce résultat confirme les résultats obtenus dans la lignée HEMC et suggère l'importance de la 3-O-sulfatation des HS dans le comportement des cellules tumorales (Publication n°2, Bui C. et al., en préparation).

Les résultats de cette partie du travail laissent envisager des perspectives prometteuses dans la découverte et la compréhension de nouveaux mécanismes cellulaires basés sur la reconnaissance de certains motifs portés par les HS présents à la surface des cellules tumorales et qui participeraient de façon critique au processus de cancérogénèse. De plus, en raison du caractère réversible des méthylations de l'ADN, ces travaux ouvrent des perspectives encourageantes dans le traitement anti-cancéreux basé sur l'emploi d'inhibiteurs des DNMTs.

Matériels et méthodes

Matériels

I. LIGNÉES CELLULAIRES ET REACTIFS DE CULTURE CELLULAIRE

La lignée de chondrosarcome humain H-EMC-SS, la lignée d'adénocarcinome humain de sein MCF7 et les cellules HeLa (cellules épithéliales humaines de carcinome de col utérin) sont obtenues auprès de la banque de cellules « European Collection of Cell Culture » (ECACC, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les cellules CHO pgsB-618 (cellules d'ovaire de hamster chinois déficientes en β 4GalT7, CRL-2241) proviennent de la banque de cellules « American Type Culture Collection » (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France).

Les chondrocytes humains ont été fournis par la société PromoCell (Heidelberg, Allemagne). Les milieux de culture DMEM, DMEM/F12, Fischer, et RPMI 1640 sont fournis par GIBCO (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Les inserts de culture utilisés pour les tests de cicatrisation et d'invasion cellulaires proviennent d'Ibidi (Biovalley, Marne-la-Vallée, France). Les plaques de culture avec Transwell (8.0 μ m, membrane de polycarbonate) utilisées pour les tests de migration cellulaire et la fibronectine issue de fibroblastes humains pour le test d'adhésion cellulaire sont fournies par Sigma-Aldrich.

II. REACTIFS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

L'ADN génomique cellulaire a été extrait à l'aide du kit « GenomicPrep DNA isolation » (GE Healthcare, Amersham, Grande-Bretagne). Le kit d'extraction des ARN totaux « SV Total RNA Isolation System », et le vecteur de clonage pGEM-T-easy TA sont fournis par Promega (Charbonnières, France). Le kit de conversion au bisulfite « Epitect Bisulfite » est obtenu auprès de QIAGEN GmbH (Hilden, Allemagne). La réaction de transcription inverse (*reverse transcriptase*, RT) est réalisée avec le kit SuperScript VILO (Invitrogen). L'amplification par polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) est réalisée au moyen de l'ADN polymérase Bio-X-ACT (Bioline Ltd, Londres, Grande-Bretagne).

L'ADN génomique de cellules sanguines, les ARN totaux de cerveau humain et de placenta proviennent de Clontech (Mountain View, CA). La quantification de l'ADN a été réalisée au moyen du kit Quant-iT™ dsDNA HS (Invitrogen).

Les clones I.M.A.G.E des ADNc codant les 3-OST1 ou 3-OST3A humaines ont été obtenus auprès de Geneservice (Cambridge, Grande-Bretagne).

III. REACTIFS RADIOMARQUES

La D-[6-³H(N)]-glucosamine, le sulfate de sodium Na₂SO₄ [³⁵S], l'uridine 5'-diphospho-D-[U-¹⁴C]-galactose et le mélange « EasyTag express protein labeling, [³⁵S] » proviennent de Perkin Elmer Life Science (Courtaboeuf, France).

Le marqueur de masse moléculaire « RainbowTM [¹⁴C] methylated protein molecular weight » est fourni par Amersham Biosciences (GE Healthcare).

IV. REACTIFS BIOCHIMIQUES

La 4-méthylumbelliférol-β-D-xylopyranoside (4-MOX), l'uridine 5'-diphosphogalactose (UDP-Gal), la 5-aza-2'-déoxycytidine (5-Aza-dc), l'héparinase I de *Flavobacterium heparinum* et la chondroïtinase ABC from *Proteus vulgaris*, la protéinase K de *Tritirachium album*, la résine Sepharose CL-6B sont fournis par Sigma-Aldrich. La résine Sephadex G-50 fine est obtenue auprès d'Amersham Biosciences (GE Healthcare).

Les héparitinases I et II et les anticorps anti-HS (épitope 10E4) proviennent de Seikagaku Corporation (Coger, Paris, France).

Les cassettes « prêtes à l'emploi » de gel à gradient (4-12% Bis-Tris) « Gel Criterion XT », le tampon XT MOPS (acide N-morpholino-3-propane sulfonique) et la préparation « Macro-Prep DEAE Support » sont fournis par Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France).

Le réactif utilisé pour le développement des immunoblots en chimiluminescence est le « Western Blot Reagent » (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Les anticorps primaires anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) et anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) de lapin et l'anticorps anti-IgG de lapin couplé au substrat HRP (*horseradish peroxidase*) viennent de « Cell Signaling » (Danvers, MA).

Les films Hyperfilm MP utilisés pour les autoradiographies et la chimiluminescence sont fournis par Amersham Biosciences (GE Healthcare).

Le facteur de croissance « recombinant human KGF/FGF-7 » est fourni par « R&D Systems Europe » (Lille, France).

Méthodes expérimentales

I. SYSTEMES D'EXPRESSION HETEROLOGUE DANS LES CELLULES EUCARYOTES

L'ADNc codant pour la β 4GalT7 humaine sauvage ou mutée a été exprimé de façon transitoire dans les cellules eucaryotes HeLa en vue de la détermination des constantes

cinétiques apparentes, et l'analyse du taux de biosynthèse des PGs totaux par incorporation de ³⁵S en culture monocouche a été réalisée dans les cellules CHO pgsB-618. Les cellules HeLa permettent une meilleure efficacité de transfection et fournissent suffisamment de matériel protéique pour la réalisation de l'ensemble des études cinétiques (sauvage et mutants). Les cellules CHO pgsB-618 présentent l'avantage d'être déficientes en β4GalT7, ce qui permet d'attribuer spécifiquement à l'enzyme recombinante sauvage ou mutée les effets observés sur le taux de biosynthèse de PGs.

Les STs 3-OST1 et 3-OST3A recombinantes humaines ont été exprimées de façon transitoire dans les cellules HEMC afin de réaliser les marquages en immunofluorescence des HS cellulaires, l'étude qualitative et quantitative des HS par analyses chromatographiques et la réalisation des essais de prolifération, d'adhésion et de migration cellulaires.

I.1 Construction des plasmides

Le vecteur d'expression codant la β4GalT7 recombinante humaine

La séquence codant la β4GalT7 a été clonée à partir d'une banque d'ADNc de placenta (Clontech) par PCR à l'aide d'amorces nucléotidiques basées sur la séquence publiée par Almeida et al. (1999) comme précédemment décrit (Gulberti et al., 2005).

Pour l'expression dans les cellules de mammifères en culture, le vecteur de clonage PCR2.1-GalTmyc a été digéré par les enzymes de restriction *KpnI-XbaI* et l'insert codant la séquence de la β4GalT7 étiquetée myc, a été sous-cloné dans les sites *ad hoc* du vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3.1(+) (Invitrogen) pour produire le vecteur pcDNA-GalTmyc.

Gène	Amorce	Séquence
<i>β4GalT7</i>	Sens	5'CAGGTACCATGTTCCCTCG 3'
	Antisens	5'CTCTAGACTACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCGCTGAATGTG 3'

Tableau 7 : Description des amorces utilisées pour le clonage de la β4GalT7

Le vecteur d'expression codant la décorine recombinante humaine

La séquence codant la décorine a été clonée par PCR à partir d'une banque d'ADNc en utilisant les amorces présentées dans le tableau ci-dessous. Pour l'expression dans les cellules de mammifères en culture, le vecteur de clonage PCR2.1-décorineHis a été digéré par les enzymes de restriction *AflIII-XhoI* et l'insert contenant la séquence de la décorine étiquetée par un pentaHis a été sous-cloné dans les sites *ad hoc* du vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3.1(+) pour produire le vecteur pcDNA-décorineHis.

Gène	Amorce	Séquence
<i>décorine</i>	Sens	5'TCTTAAGACCATGGCCGCCACTACCCTCCTTCTGCTTGC 3'
	Antisens	5'ACTCGAGTCAATGATGATGATGATGATGCTTATAGTTTCCGAG 3'

Tableau 8 : Description des amorces utilisées pour le clonage de la décorine

Le vecteur d'expression codant les sulfotransférases recombinantes humaines 3-OST1 et 3-OST3A

Les séquences codant les enzymes 3-OST1 et 3-OST3A ont été amplifiées par PCR respectivement à partir des clones I.M.A.G.E en utilisant des séquences oligonucléotidiques contenant en 5' le site de restriction *Hind*III et en 3' la séquence étiquette YPYDVPDYA-hémagglutine (HA) et le site de restriction *Xho*I. Les fragments d'ADN ainsi amplifiés ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression pcDNA3.1(+) pour générer les plasmides pcDNA-3OST1HA et pcDNA-3OST3AHA.

Gène	Amorce	Séquence
3- <i>OST1</i>	Sens	5'CAAGCTTGCCATGGCCGCGCTGCTCC3'
	Antisens	5'GCTCGAGTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTGCCAGTC3'
3- <i>OST3A</i>	Sens	5'CAAGCTTCTGCCATGGCCCCCTCCGGGCCCCGGCCA3'
	Antisens	5'GCTCGAGTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATCCATCCCAGCCAAAGT3'

Tableau 9 : Liste des amorces utilisées pour le clonage des 3-OST1 et 3-OST3A

I.2 Mutagenèse dirigée et production des mutants de la β 4GalT7 recombinante humaine

Les mutations ont été réalisées en utilisant comme matrice le vecteur pcDNA-GalTmyc par technique de mutagenèse dirigée par PCR à l'aide du kit Quickchange™ (Stratagène, La Jolla, CA) au moyen d'amorces appropriées (Tableau 10) selon les indications du fournisseur.

Mutant	Amorce	Séquence
D163A	Sens	5' GACTACATTGCCATGCAC <u>GC</u> AGTTGCACTGCTCCCTCTC 3'
	Antisens	5' GAGAGGGAGCAGTGCAACT <u>TGC</u> GTGCATGGCAATGTAGTC 3'
D163E	Sens	5' GACTACATTGCCATGCAC <u>GAG</u> GTTGCACTGCTCCCTCTC 3'
	Antisens	5' GAGAGGGAGCAGTGCAAC <u>CTC</u> GTGCATGGCAATGTAGTC 3'
V164A	Sens	5' TAGATTGCCATGCACGAC <u>GCT</u> GACCTGCTCCCTCTCAAC 3'
	Antisens	5' GTTGAGAGGGAGCAGGTC <u>AGC</u> GTGCATGGCAATCTA 3'
D165A	Sens	5' ATTGCCATGCACGACGTT <u>GCA</u> CTGCTCCCTCTCAACGAG 3'
	Antisens	5' CTCGTTGAGAGGGAGCAGT <u>TGC</u> AACGTCGTGCATGGCAAT 3'
D165E	Sens	5' ATTGCCATGCACGACGTT <u>GAG</u> CTGCTCCCTCTCAACGAG 3'
	Antisens	5' CTCGTTGAGAGGGAGCAGT <u>CTC</u> AACGTCGTGCATGGCAAT 3'
F221A	Sens	5' ATGTCCAACCGC <u>GCG</u> TGGGGCTGGGGC 3'
	Antisens	5' GCCCCAGCCCCA <u>CGC</u> GCGGTTGGACAT 3'
F221Y	Sens	5' ATGTCCAACCGC <u>TACT</u> GGGGCTGGGGC 3'
	Antisens	5' GCCCCAGCCCCA <u>GTA</u> GCGGTTGGACAT 3'
W222A	Sens	5' TCCAACCGCTTC <u>GCG</u> GGCTGGGGCCGC 3'
	Antisens	5' GCGGCCCCAGCC <u>CGC</u> GAAGCGGTTGGA 3'
W222F	Sens	5' TCCAACCGCTTC <u>TTT</u> GGCTGGGGCCGC 3'
	Antisens	5' GCGGCCCCAGCC <u>AAA</u> GAAGCGGTTGGA 3'
G223A	Sens	5' AACCGCTTCTGG <u>GCG</u> TGGGGCCGCGAG 3'
	Antisens	5' CTCGCGGCCCA <u>CGC</u> CCAGAAGCGGTT 3'
W224A	Sens	5' CGCTTCTGGGGC <u>GCG</u> GGCCGCGAGGAC 3'
	Antisens	5' GTCCTCGCGGCC <u>CGC</u> GCCCCAGAAGCG 3'
W224H	Sens	5' CGCTTCTGGGGC <u>CAC</u> GGCCGCGAGGAG 3'
	Antisens	5' TCCTCGCGGCC <u>GTG</u> GCCCCAGAAGCG 3'
W224F	Sens	5' CGCTTCTGGGGC <u>TTG</u> GGCCGCGAGGAG 3'
	Antisens	5' TCCTCGCGGCC <u>GAA</u> GCCCCAGAAGCG 3'
G225A	Sens	5' TTCTGGGGCTGG <u>GCG</u> CGCGAGGACGAC 3'
	Antisens	5' GTCGTCTCGCG <u>CGC</u> CCAGCCCCAGAA 3'
E227A	Sens	5' GGCTGGGGCCGCG <u>GCG</u> GACGACGACTTC 3'
	Antisens	5' GAACTCGTCGT <u>CGC</u> GCGGCCCCAGCC 3'
E227D	Sens	5' GGCTGGGGCCGCG <u>GAC</u> GACGACGACTTC 3'
	Antisens	5' GAACTCGTCGT <u>GTC</u> GCGGCCCCAGCC 3'
D228A	Sens	5' TGGGGCTGGGGCCGCGAG <u>GCA</u> GACGAGTTCTACCGGCGC 3'
	Antisens	5' GCGCCGTTAGAACTCGTC <u>TGC</u> CTCGCGGCCCCAGCCCCA 3'
D228E	Sens	5' TGGGGCTGGGGCCGCGAG <u>GAG</u> GACGAGTTCTACCGGCGC 3'
	Antisens	5' GCGCCGTTAGAACTCGTC <u>CTC</u> CTCGCGGCCCCAGCCCCA 3'
D229A	Sens	5' GGCTGGGGCCGCGAGGAC <u>GCA</u> GAGTTCTACCGGCGCATT 3'
	Antisens	5' AATGCGCCGTTAGAACTC <u>TG</u> CTGCCTCGCGGCCCCAGCC 3'
D229E	Sens	5' GGCTGGGGCCGCGAGGAC <u>GAG</u> GAGTTCTACCGGCGCATT 3'
	Antisens	5' AATGCGCCGTTAGAACTC <u>CTC</u> CTGCCTCGCGGCCCCAGCC 3'
E230A	Sens	5' CGCGAGGACGAC <u>GCG</u> TTCTACCGGCGC 3'
	Antisens	5' GCGCCGTTAGAA <u>CGC</u> GTCGTCTCGCG 3'

Tableau 10 : Description des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée

Le codon muté est souligné et en gras.

I.3 Transfection transitoire des cellules eucaryotes par le plasmide codant la β 4GalT7 recombinante humaine et les mutants

Dans le plasmide d'expression eucaryotique pcDNA-GalTmyc, l'expression de la protéine recombinante est placée sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV). Les

cellules HeLa et CHO pgsB-618 sont cultivées en plaques 6 puits en milieu DMEM et DMEM/F12, respectivement, contenant de la glutamine (1%, v/v), de la pénicilline-streptomycine (1%, v/v) et du sérum de veau fœtal (SVF ; 10%, v/v). Chacune des lignées cellulaires est transfectée de façon transitoire par le plasmide codant l'enzyme sauvage ou mutée. La transfection de l'ADN plasmidique est réalisée en utilisant un agent de transfection lipidique, l'ExGen 500 (Euromedex, Souffelweihersheim, France) selon les recommandations du fournisseur. Le mélange de transfection (2.5 µg ADN plasmidique / puits) est étalé sur le tapis de cellules et laissé incubé 3 h.

Les cellules HeLa sont collectées 48 h après transfection puis centrifugées à 4°C durant 10 min à 5 000 x g. Les culots sont repris dans du tampon 0.25 M saccharose, 5 mM HEPES (pH 7.4) et l'homogénat cellulaire est soniqué (1 fois, 5 sec avec 10 sec d'intervalle) préalablement au dosage de protéines totales par la méthode de Bradford (1976) et aux essais enzymatiques.

Parallèlement, la mesure du taux d'incorporation de ³⁵S *ex vivo* nécessite dans un premier temps une incubation des cellules CHO pgsB-618 pendant une durée de 9 h en milieu Fischer (déplété en sulfates) contenant 10 µCi/ml de Na₂SO₄ radiomarqué. La quantification du taux d'incorporation de soufre radiomarqué dans les PGs totaux sera possible dans un second temps après extraction et purification des PGs excrétés dans les milieux de culture grâce à une précipitation spécifique par le chlorure de cétypyridinium (CPC).

Les taux d'expression des enzymes dans les deux systèmes d'expression hétérologue sont analysés par immunoblot et quantifiés au moyen d'une gamme étalon de protéine GST-myc (Thermo Scientific, Cergy Pointoise, France).

I.4 Transfection des cellules HEMC par le plasmide codant les sulfotransférases 3-OST1 ou 3-OST3A

Les cellules HEMC sont cultivées sur milieu DMEM/F12 complet et sont transfectées de façon transitoire par le plasmide pcDNA-3OST1HA ou le plasmide pcDNA-3OST3AHA. La transfection de l'ADN plasmidique est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. Les cellules HEMC sont récupérées 48 h après transfection afin de réaliser les tests cellulaires (migration, prolifération et adhésion) ou fixées sur des lamelles de verre pour les analyses en immunofluorescence indirecte.

Dans le cas des transfections stables des 3-OST1 ou 3-OST3A, 24 h après transfection, les cellules sont récupérées après traitement à la trypsine, diluées au 1/10^{ème}, puis cultivées dans des boîtes de culture (10 cm²) en milieu DMEM/F12 complet contenant 0.5 mg/ml de

généricine (G-418) comme antibiotique de sélection. La dose d'antibiotique utilisée pour la sélection a été préalablement validée pour cette lignée cellulaire. Après trois semaines de culture dans l'étuve, des colonies isolées apparaissent sur les boîtes de culture et sont repiquées puis amplifiées. Le taux d'expression des enzymes d'intérêt est vérifié pour chaque clone par immunoblot au moyen d'un anticorps anti-HA de souris. Les clones exprimant les enzymes sont ensuite amplifiés et stockés dans des ampoules de congélation dans l'azote liquide.

Nous avons procédé de la même manière pour la lignée cellulaire CHO pgsB-618 exprimant de façon stable la décorine recombinante humaine.

I.5 Traitement des cellules MCF7 avec le facteur de croissance FGF-7

Deux jours après transfection, les cellules surexprimant la 3-OST1 ou la 3-OST3A sont cultivées durant une nuit sur un milieu déplété (0% de SVF) afin d'inactiver les voies de signalisation des cellules par les facteurs de croissance présents dans le SVF. Le lendemain, les cellules sont traitées avec le FGF-7 dilué à la concentration finale de 1 ng/ml dans du milieu de culture sans SVF. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis récupérées par grattage. Les concentrations protéiques des fractions cellulaires sont déterminées avant analyse par immunoblot en chimiluminescence.

II. TESTS CELLULAIRES

II.1 Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est estimée par comptage direct du nombre de cellules sur une cellule de Malassez ou par mesure de la quantité d'ADN (ng/ml) par fluorimétrie.

Après traitement à la 5-Aza-dc ou transfection par l'un des plasmides pcDNA-3OST1HA ou pcDNA-3OST3AHA, les cellules HEMC ou MCF7 sont récoltées, diluées à la densité de 500 000 cellules/ml puis cultivées sur une plaque de 24 puits (25 000 cellules/puits). Les mesures sont réalisées en triple sur deux séries différentes.

II.2 Test d'adhésion cellulaire

Ce test permet de mesurer les capacités d'adhésion des cellules en utilisant comme substrat la fibronectine qui est une glycoprotéine de la MEC. Les plaques de culture de 96 puits sont préalablement incubées avec 100 ou 200 µg de fibronectine en solution durant 1 h à l'étuve à 37°C. Des puits sans fibronectine sont également prévus et serviront de contrôle négatif afin d'évaluer l'adhésion non spécifique. L'ensemble des puits est ensuite lavé à deux reprises

avec un tampon de lavage correspondant à du milieu de culture à 0.1% (p/v) ASB (Albumine Sérique Bovine). Une étape de blocage d'une durée de 1 h avec une solution de milieu de culture contenant 0.5% (p/v) ASB est ensuite effectuée. Après lavage, les plaques de culture préincubées ou non avec la fibronectine sont placées sur de la glace. Pendant ce temps, les cellules utilisées pour le test sont récupérées par traitement à la trypsine et reprises dans du milieu DMEM/F12 complet à la densité cellulaire de 500 000 cellules/ml. Chaque puits estensemencé avec 25 000 cellules (soit un volume de 50 μ l). Les cellules sont placées à l'étuve à 37°C pendant 30 min ou 1h30. Après incubation, les plaques sont lavées deux fois avec une solution de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) puis fixées durant 20 min avec une solution de PFA (*para*-formaldéhyde) 4% (p/v) et rincées à nouveau avec une solution de PBS afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes sont colorées 20 min avec une solution de « crystal violet » 1% (p/v) puis lavées trois fois avec de l'eau distillée. Enfin, un dernier traitement avec une solution d'acide acétique 10% (v/v) permet la lecture de densité optique sur un spectrophotomètre SAFAS flx-Xenius (Monaco) à la longueur d'onde de 550 nm. Les mesures sont réalisées en triple sur deux séries différentes.

II.3 Test de cicatrisation et d'invasion cellulaire ou « wound healing »

Ce test consiste à créer une cicatrice ou brèche au niveau d'un tapis cellulaire et à évaluer le temps nécessaire aux cellules disposées de part et d'autre de la cicatrice pour migrer et combler la brèche.

Pour ce faire, nous disposons d'inserts de culture en silicone autocollants qui sont placés au fond d'un puits d'une plaque de culture. Ces inserts ont la particularité d'être composés de deux chambres distinctes séparées par une membrane de 500 μ m d'épaisseur qui est imperméable à la fois au milieu de culture et aux cellules. Les cellules à tester sont ainsiensemencées séparément dans chacune des deux chambres de l'insert au nombre de 35 000 cellules par chambre et incubées durant toute la nuit à l'étuve à 37°C afin d'obtenir une adhésion complète. Le lendemain, l'insert est retiré avec une pince, le puits rincé et rempli avec du milieu de culture complet. Plusieurs photos de cette brèche sont prises à différents temps (de T0 jusque T24, à intervalle de 4 h) afin de suivre les processus de prolifération et de migration cellulaires participant au comblement de la cicatrice. L'analyse des images et la quantification des aires durant la fermeture de la cicatrice sont réalisées aux différents temps avec l'aide du logiciel de traitement et d'analyse d'images Image J.

II.4 Test de migration cellulaire en chambre de Boyden

Ce dispositif permet de mesurer la capacité de migration des cellules à travers une membrane poreuse grâce à l'attraction exercée par un agent chimiotactique qui dans notre cas est le SVF. Les cellules sont incubées à 37°C durant 2 h dans du milieu DMEM/F12 complet contenant 10 µg/ml de mitomycine C (Sigma-Aldrich) afin de bloquer la prolifération cellulaire. Elles sont ensuite récupérées par traitement à la trypsine, reprises dans du milieu sans SVF mais contenant 0.1% d'ASB (p/v) et enfinensemencées sur les nacelles de Transwell. Après adhésion sur la membrane de polycarbonate, les cellules pourront migrer à travers les pores de la membrane pour rejoindre le compartiment inférieur rempli de milieu de culture complet supplémenté avec 5% (v/v) de SVF. Après 18 h d'incubation à l'étuve à 37°C, les nacelles contenant des cellules adhérees sur leurs faces supérieure et inférieure, sont rincées dans une solution de PBS, fixées avec une solution de PFA à 4% (p/v) puis colorées au bleu de méthylène. Après une série de trois lavages au PBS, les membranes des nacelles sont soigneusement découpées, incubées durant 10 min dans une solution de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 1% (p/v) afin de permettre la mesure de la densité optique à 663 nm sur spectrophotomètre SAFAS flx-Xenius. Les mesures sont réalisées en triple sur deux séries différentes.

Pour l'ensemble des tests cellulaires effectués, des études statistiques d'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur ont été réalisées et la correction de Bonferroni a été appliquée.

III. PREPARATION ET ANALYSE DES PROTEINES RECOMBINANTES EXPRIMEES DANS LES CELLULES EUCARYOTES

III.1 Analyse du taux d'expression des protéines recombinantes par immunoblot

L'analyse du taux d'expression des protéines recombinantes est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) dans des conditions dénaturantes afin de permettre une séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Les échantillons protéiques contenant 15 à 20 µg de protéines totales sont dilués dans le tampon de Laemmli (v/v) (1970) et portés à ébullition pendant 2 à 3 min avant dépôt. La migration des échantillons à travers le gel de SDS-PAGE se fait dans du tampon d'électrophorèse à ampérage constant (15 mA) durant 1h30 environ.

Après transfert, la membrane est placée sous agitation durant 1h dans une solution de 3% d'ASB (p/v). L'hybridation de la membrane fait intervenir successivement deux anticorps : le premier est un anticorps monoclonal dirigé contre l'étiquette de l'enzyme recombinante (soit

un anticorps anti-myc pour la β 4GalT7 ou un anticorps anti-HA pour les 3-OST1 et -3A) et le deuxième un anticorps anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich). Après plusieurs étapes de lavage au TBST (*Tris Buffer Saline Tween*), la membrane est révélée par ajout de BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ nitro blue tetrazolium), substrat de la phosphatase alcaline. La réaction enzymatique produit une coloration bleu-violet des protéines reconnues par le premier anticorps.

Une gamme de GST-myc est également déposée sur le même gel afin d'évaluer la quantité d'enzyme recombinante exprimée dans les échantillons testés. L'évaluation semi-quantitative de l'intensité des bandes révélées par immunoblot a été réalisée par densitométrie à l'aide du logiciel Scion Image 1.63.

Nous avons également utilisé la chimiluminescence dans le cas de l'analyse des protéines p44/42 (MAPK) et Phospho-p44/42 (MAPK) pour évaluer leur taux d'expression car cette méthode a l'avantage d'être plus sensible. Nous avons procédé de la même manière que précédemment jusqu'aux étapes de lavages précédant la révélation. La membrane est incubée avec le réactif luminol durant 1 à 2 min puis est exposée sur un film photosensible avant révélation.

III.2 Evaluation de l'activité galactosyltransférase et détermination des constantes cinétiques apparentes par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La mesure d'activité enzymatique a été développée au laboratoire (Gulberti et al., 2005). Elle est basée sur l'incubation de la fraction protéique en présence de substrat donneur (UDP-Gal, froid et radioactif) et de substrat accepteur, la 4-MOX.

Les produits de la réaction sont séparés par CLHP en phase inverse couplée à une détection en radioactivité au moyen d'un radiodétecteur et un lecteur UV-visible. Les incubations standard sont réalisées dans un volume final de 50 μ l contenant :

- 100 mM tampon cacodylate de sodium, 10 mM $MnCl_2$ (pH 7.0),
- 40 μ g de protéines cellulaires,
- 1 mM UDP-Gal,
- 1.85 KBq (2 μ l) UDP-[U- ^{14}C]-Gal (11.4 GBq/mmol),
- 5 mM 4-MOX.

Le mélange réactionnel est incubé à 37°C durant 60 min. La réaction est arrêtée en plaçant les essais dans la glace et ajout de 5 μ l d'HCl 6N. Les essais sont centrifugés 10 min à 10 000 x g, à 4°C puis les surnageants injectés sont analysés par CHLP à température ambiante.

Les essais enzymatiques sont réalisés en double sur les homogénats cellulaires issus de trois transfections différentes. Dans le cas du contrôle négatif, le substrat accepteur est remplacé par du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Les constantes cinétiques apparentes K_m et V_{max} sont déterminées vis-à-vis des substrats donneur et accepteur pour l'enzyme sauvage et les mutants à partir des homogénats cellulaires des cellules HeLa.

Le système d'analyse chromatographique consiste en un automate (SpectraSystem AS3000) doté d'une boucle d'injection de 100 μ l, deux pompes (l'une délivrant la phase mobile (1 ml/min), l'autre le scintillant (2 ml/min)), et une colonne C18-phase inverse, Apollo C18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m) (Alltech, Templemars, France). La radioactivité associée à l'UDP-Gal et au produit de réaction après séparation est détectée par un radiodétecteur (LB 507 A, Berthold, Thoiry, France) comportant une cellule de détection en scintillation liquide. Le système est piloté par le logiciel Class-VP relié à un intégrateur SS 420 χ , Scientific Software, Inc.) pour l'acquisition et l'exploitation des résultats. La composition de la phase mobile est de 14% acétonitrile/H₂O (v/v), 0,02% (v/v) acide trifluoroacétique (TFA).

Les essais sont réalisés en double sur trois séries de transfections différentes.

Exploitation des données

Les valeurs de K_m et V_{max} ont été calculées à l'aide du logiciel d'ajustement non linéaire, SigmaPlot 9.0 (Erkraft, Allemagne) à partir de l'équation de Michaelis-Menten :

$v = (V_{max} \times S)/(K_m + S)$ où v , représente la vitesse initiale, K_m , la constante de Michaelis-Menten, S , la concentration en substrat (mM), et V_{max} , la vitesse maximale de la réaction.

Les valeurs d'activité présentées correspondent à la moyenne \pm SD d'expériences réalisées en triple. Les analyses statistiques sont réalisées au moyen du logiciel GraphPad Prism 5. Les différences entre les groupes de valeurs sont considérées significatives lorsque $p \leq 0.05$ (test ANOVA avec correction de Bonferroni).

IV. ETUDE DES PROFILS DE METHYLATION DES GENES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES PGs à HS ET ANALYSES QUALITATIVES ET QUANTITATIVES DES PGs à HS PRODUITS

IV.1 Etablissement des cartes de méthylation des gènes codant les GTs et les STs

Les cartes de méthylation sont établies grâce à la méthode de conversion au bisulfite qui modifie de façon chimique les résidus cytosines en uraciles lorsque l'ADN n'est pas méthylé. Dans le cas contraire, les cytosines méthylées demeurent inchangées.

Extraction de l'ADN génomique cellulaire – Elle se fait à partir des culots cellulaires en utilisant le kit de préparation d'ADN génomique selon les recommandations du fournisseur. La quantité et la pureté de l'ADN sont déterminées sur spectrophotomètre NanoDrop 1000 par mesure du rapport de densité optique 260/280.

Conversion au bisulfite – L'ADN génomique extrait (1-2 µ g/essai) est soumis à une conversion au bisulfite au moyen du kit en suivant les instructions du fournisseur.

Nested-PCR – Elle consiste en deux réactions de PCR successives en vue d'amplifier les séquences d'intérêt. Les conditions pour la 1^{ère} étape de PCR sont les suivantes : 1 cycle de 8 min à 94°C puis 20 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 52°C, 30 sec à 72°C, et une étape d'extension de 10 min à 72°C. Les conditions de PCR pour la 2^{ème} étape comprennent 1 cycle à 8 min à 94°C puis 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 30 sec à 72°C, et une extension finale de 10 min à 72°C. Les produits de la 2^{ème} PCR sont dans un premier temps directement séquencés puis sous-clonés dans le plasmide pGEM-T-easy TA (Promega, Madison, WI). Dans ce cas, au moins deux clones par gène d'intérêt sont séquencés afin d'établir leur profil de méthylation dans le type cellulaire étudié.

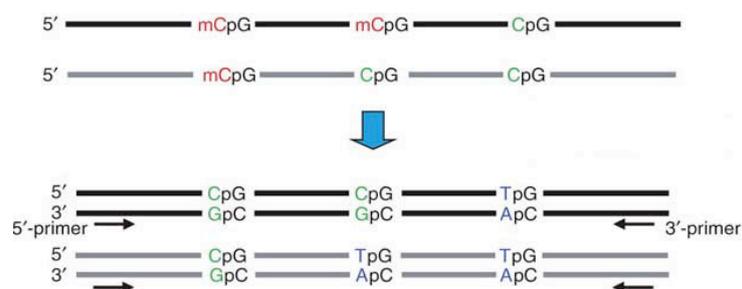


Figure 18 : Schéma de conversion chimique au bisulfite des cytosines

Les deux brins d'ADN présentent des cytosines méthylées (en rouge) et non méthylées (en vert). Après conversion au bisulfite et un cycle d'amplification par PCR, les cytosines non méthylées sont changées en thymines alors que les cytosines méthylées demeurent inchangées.

Source : <http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n8/images/nprot.2007.271-F2.jpg>

IV.2 Analyse du taux d'expression des ARN messagers (ARNm) après traitement à la 5-Aza-dc

Traitement des cellules à la 5-Aza-dc

Pour le traitement à la 5-Aza-dc (Sigma-Aldrich), les cellules sontensemencées à la densité de 20 000 cellules/cm². La 5-Aza-dc est ajoutée dans le milieu de culture des cellules aux concentrations finales de 0, 2 et 4 µM pendant 7 jours. En fin de traitement, les cellules sont rincées avec une solution de PBS et récupérées par centrifugation après grattage.

Extraction des ARN totaux des cellules et analyses en RT-PCR semi-quantitative

Les ARN totaux sont isolés à partir des cellules traitées et non traitées au moyen du kit « SV Total RNA Isolation System ». 0.2-0.5 µg d'ARN totaux sont utilisés pour la réaction de transcription inverse en suivant les indications du fournisseur. L'ADNc issu de la réaction de RT est amplifié par PCR selon les conditions suivantes : 1 cycle de 3 min à 94°C suivi de 24-35 cycles à 94°C pendant 45 sec, à 54°C pour l'EXT1 et la 3-OST6, 56°C pour la 3-OST3B, 58°C pour la 3-OST1, la 3-OST2, la NDST1, la NDST2, la HS6ST1, la HS2ST1, 60°C pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la NDST3, la NDST4 et la HS6ST2, 63°C pour la HS6ST3 et la 3-OST3A et à 72°C durant 45 sec puis une extension finale à 72°C durant 5 min. Les conditions de PCR sont détaillées en annexe (Tableau 2) de la Publication n°1.

Les produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 2%, quantifiés par densitométrie au moyen du logiciel Scion Image 1.63 et standardisés par le contrôle interne GAPDH.

Les gènes *NDST3*, *NDST4* et *HS6ST3* n'ont pu être détectés dans les ARN totaux des cellules HEMC mais la vérification de l'amplification a été réalisée à partir d'ARN totaux de placenta et de cerveau.

V. ANALYSES QUALITATIVES ET QUANTITATIVES DES PGs MATRICIELS ET EXCRETES

V.1 Analyse en immunofluorescence des HS cellulaires

Pour les analyses en immunofluorescence indirecte visant à marquer les chaînes d'HS matriciels et cellulaires, les cellules traitées et non traitées sont lavées avec du tampon PBS, fixées avec une solution de PFA à 4% durant 20 min, bloquées avec une solution de 5% de sérum de chèvre, et enfin incubées en présence de l'anticorps primaire anti-HS (10E4) (dilution 1/50) (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japon) pendant 1 h. Les cellules sont ensuite lavées puis incubées 1 h en présence du deuxième anticorps conjugué à l'AlexaFluor 488 anti-souris de chèvre (Molecular Probes, Invitrogen). Après lavage, les lamelles sont incubées en

présence d'une solution de Hoechst à 1 mg/ml afin de colorer les noyaux cellulaires. Enfin, les lamelles sont lavées dans une solution de PBS puis montées sur lames à l'aide du Moviol (National Diagnostics, Hull, Grande-Bretagne) avant analyse des images sur un microscope à fluorescence (Leica DMI3000 B).

De façon parallèle, les analyses en immunofluorescence de l'expression de la 3-OST1 et de la 3-OST3A étiquetées HA ont nécessité une étape supplémentaire de perméabilisation au Triton X-100 à 0.1% après fixation au PFA. L'anticorps anti-HA anti-souris utilisé pour visualiser les protéines d'intérêt est conjugué à un fluorophore, la fluorescéine (FITC, *fluorescein isothiocyanate* ; Sigma-Aldrich).

V.2 Analyses qualitatives et quantitatives des PGs après radiomarquage

V.2.1 Mesure du taux de biosynthèse des PGs totaux par incorporation de ³⁵S

Radiomarquage des cellules - Les cellules cultivées en monocouche sont incubées durant 9 h en milieu Fischer en présence de ³⁵S (10 µCi/ml).

Extraction et purification des PGs cellulaires par précipitation au CPC - Le protocole d'extraction des PGs cellulaires a été adapté à partir de la méthode décrite par Ha et al. (2005). Après incubation des cellules en présence de ³⁵S, les milieux de culture sont dilués dans le tampon de digestion de la papaïne contenant 20 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA et 5 mM L-cystéine (pH 6.8) et 1 mg/ml de papaïne. Les milieux sont incubés pendant 3 h à 60°C. La réaction de digestion à la papaïne est arrêtée en portant les échantillons à ébullition durant 10 min. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 8 000 x g puis trois volumes de solution d'acétate de potassium (5% préparé dans de l'éthanol absolu, p/v) sont ajoutés aux surnageants pendant 12 h à 4°C pour permettre une première précipitation des chaînes de GAG. Les tubes sont centrifugés durant 30 min à 8 000 x g, les surnageants éliminés et les culots repris dans une solution de NaCl (0.2 M). Après addition aux surnageants d'une solution de CPC à 5% (p/v) et d'une solution de CS de requin (100 mg/ml), les tubes sont placés durant 2 h dans une étuve à 37°C puis à nouveau centrifugés durant 30 min à 8 000 x g. Enfin, après une série de lavages, les culots obtenus sont repris dans une solution de NaCl (2.5 M) à laquelle cinq volumes d'éthanol absolu sont ajoutés. Les échantillons sont centrifugés une dernière fois durant 30 min à 10 000 x g puis les culots finaux sont repris dans une solution tampon de Tris-HCl (0.2 M, pH 8.0). La radioactivité associée aux GAGs purifiés est évaluée par comptage en scintillation liquide dans le cocktail de scintillation Ultima Gold.

V.2.2 Isolation et analyse qualitative et quantitative des macromolécules radiomarquées

Radiomarquage des cellules - Les cellules cultivées en monocouche sont incubées durant 22 h en milieu Fischer en présence de ^{35}S (10 $\mu\text{Ci/ml}$).

Dessalage des milieux de culture et lysats cellulaires

Après 22 h de marquage, les milieux de culture sont collectés, centrifugés et les cellules sont lavées au PBS, récupérées par grattage dans du tampon de lyse (solution de PBS contenant 1% (p/v) de SDS) puis centrifugées afin d'éliminer les débris cellulaires. La radioactivité non incorporée est éliminée par passage des milieux de culture et des lysats cellulaires sur une colonne de Sephadex G-50.

Digestion spécifique par les endoglycosidases

Les éluats récupérés après passage sur colonne et contenant les macromolécules radiomarquées sont digérés de façon spécifique par la chondroïtinase ABC ou un mélange d'héparitinases I et II dans les tampons correspondants durant 3 h à 37°C. Les échantillons digérés sont ensuite analysés par électrophorèse ou par technique de chromatographie liquide basse pression.

V.2.2.1 Analyse des PGs par SDS-PAGE en gel de polyacrylamide à gradient (4-12% Bis-Tris)

Après digestion spécifique comme précédemment décrit, les échantillons sont dilués dans du bleu de dépôt en présence d'un agent réducteur puis portés à ébullition avant dépôt sur gel. Après migration, le gel est fixé durant 2 h dans une solution eau/acide acétique/méthanol (5 : 1 : 1) (v/v) puis incubé 1 h dans une solution amplificatrice de signal. Le gel est finalement séché puis mis à exposer sous film à l'abri de la lumière à -20°C durant au moins 3 jours.

V.2.2.2 Chromatographie échangeuse d'anions

La phase stationnaire de la colonne correspond à un volume de 2 ml de résine polyosidique chargée négativement de type DEAE (diéthylaminoéthyle). Avant le dépôt sur la colonne DEAE, les échantillons digérés sont dilués dans un tampon contenant 8 M d'urée, 0.02 M de Bis-tris, et 0.05 M de NaCl (pH 6.0) dans 1 ml de volume d'injection. L'application d'un gradient linéaire de NaCl (0.05-0.8M) sur la colonne permet d'éluer les composés chargés négativement préalablement retenus sur la colonne.

V.2.2.3 Chromatographie d'exclusion stérique

Les échantillons récupérés après dessalage sur colonne Sephadex G-50 sont digérés dans un premier temps par la protéinase K dans une solution tampon de 10 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ (pH 8.0) durant 2 h puis évaporés en totalité. Ils sont repris dans un second temps dans les solutions tampon correspondantes afin de réaliser les digestions par les endoglycosidases selon les mêmes conditions décrites que précédemment. Après digestion, les échantillons sont dilués dans le tampon de phase mobile (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl et 0.1% Triton X-100 (p/v) à pH 8.0) au volume final de 500 µl puis déposés sur colonne (1cm x 40cm). Le volume mort (V_0) et le volume total (V_t) sont respectivement indiqués par le bleu dextran et le chromate de potassium (K₂CrO₄) qui sont ajoutés au volume final avant le dépôt sur la colonne.

La colonne a pour phase stationnaire une préparation d'agarose Sepharose CL-6B et la phase mobile de même composition que précédemment est délivrée à flux de 6 ml/h. La radioactivité associée aux fractions collectées est déterminée par comptage en scintillation liquide dans un cocktail de scintillation Ultima Gold.

I EXPLORATION DES MECANISMES DE REGULATION DES VOIES DE BIOSYNTHESE DES PGs

Bien que le rôle physiologique des PGs ainsi que leur implication dans de multiples situations pathologiques soient clairement établis, les mécanismes de régulation qui régissent leurs voies de biosynthèse sont encore mal connus. Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes responsables de la modulation de l'expression génique des enzymes de synthèse des chaînes de HS. Cette exploration a nécessité la prise en compte des gènes codant les GTs et STs impliquées respectivement dans la formation des chaînes polysaccharidiques et leurs modifications. Au cours de nos travaux, nous avons spécifiquement exploré l'implication potentielle de mécanismes de régulation épigénétique. Bien que largement décrite dans les pathologies cancéreuses, l'hyperméthylation de l'ADN reste encore peu étudiée dans le cas des atteintes articulaires qu'elles soient d'origine dégénérative ou cancéreuse. Cependant, des travaux récents suggèrent que ces mécanismes pourraient être impliqués dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde et celle de l'arthrose. Dans le cadre de notre travail, nous avons choisi en premier lieu d'étudier la lignée de chondrosarcome humain H-EMC-SS (HEMC) qui constitue un modèle de lignée invasive du tissu conjonctif.

Ce travail fait l'objet d'une première publication :

Epigenetics: Methylated-associated repression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase gene expression contributes to the invasive phenotype of H-EMC-SS chondrosarcoma cells

Catherine Bui, Mohamed Ouzzine, Ibtiham Talhaoui, Sheila Sharp, Kristian Prydz, Michael W.H. Coughtrie and Sylvie Fournel-Gigleux.

The FASEB Journal (sous presse)

I.1 Etablissement de la cartographie de méthylation des gènes codant les GTs et les STs impliquées dans la synthèse des chaînes de HS dans les cellules de lignée de chondrosarcome humain HEMC

Pour mener à bien notre étude, nous avons analysé la séquence des régions promotrices des gènes codant les quatre GTs impliquées dans la biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique (XT-I, β 4GalT7, β 3GalT6, GlcAT-I), la polymérisation des chaînes de HS (EXT1), ainsi que celle des gènes responsables des N-, 2-O, 6-O et 3-O-sulfatations des résidus saccharidiques des HS. L'analyse bioinformatique de la plupart de ces gènes a révélé la présence d'îlots CpG (régions riches en CG) au niveau de leur région promotrice et du premier exon et a conduit à

l'étude de leur profil de méthylation dans les cellules de chondrosarcome. En effet, si ces régions sont généralement hypométhylées dans les cellules non cancéreuses, l'altération de leur profil provoquant en particulier l'extinction des gènes dits « suppresseurs de tumeur » constitue un mécanisme connu du processus cancéreux.

Afin de réaliser cette étude, nous avons utilisé la méthode de conversion au bisulfite qui permet de convertir de façon spécifique les cytosines non méthylées en uraciles, alors que les cytosines méthylées demeurent intactes. L'établissement des cartes de méthylation de la première série de gènes correspondant aux cinq GTs citées ci-dessus indique que les séquences étudiées présentent de très faibles taux (0 à 5%) de méthylation au niveau des îlots CpG et donc que ces gènes ne sont pas soumis à une régulation épigénétique *via* la méthylation de l'ADN (Figure 1, publication n°1). Nous avons ensuite poursuivi notre étude par l'analyse des gènes impliqués dans les *N*- et *O*-sulfatations des HS. Nous avons mis en évidence une hyperméthylation touchant les gènes *NDST1*, *HS6ST2*, *3-OST1*, *3-OST3A* et *3-OST6* avec respectivement 100%, 94%, 88%, 97%, et 38% de taux de méthylation au niveau de leur région promotrice proximale et du premier exon dans les cellules de chondrosarcome HEMC (Figures 2A et 3C, publication n°1).

Dans le but de déterminer l'impact de la méthylation de l'ADN sur l'expression des gènes hyperméthylés, nous avons traité les cellules HEMC avec un agent chimique connu pour inhiber de façon irréversible les DNMTs responsables de la méthylation de l'ADN (la 5-Aza-dc). Nous avons ensuite analysé les conséquences de ce traitement sur le taux d'expression des transcrits codés par les gènes hyperméthylés. Ainsi, nous avons déterminé le niveau d'expression des ARNm des membres des familles NDSTs, HS2STs, HS6STs et 3-OSTs impliqués dans la modification des chaînes de HS, dans les cellules de chondrosarcome.

I.2 Analyse semi-quantitative de l'expression des ARNm codés par les gènes d'intérêt après traitement à la 5-Aza-dc

Après traitement des cellules à la 5-Aza-dc, nous avons utilisé une méthode d'analyse semi-quantitative pour évaluer l'expression des transcrits correspondant aux gènes hyperméthylés. Dans notre cas, la technique quantitative de PCR en temps réel n'a pas pu être appliquée car les taux d'expression des gènes que nous cherchions à quantifier étaient, dans la plupart des cas, trop bas et ne permettaient pas de détection ou de mesure fiable des transcrits dans les cellules HEMC. Cette observation est en accord avec l'extinction de ces gènes par hyperméthylation.

Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions de RT-PCR au moyen d'ARN totaux de placenta ou de cerveau car les gènes à analyser présentent des régions riches en GC rendant leur amplification parfois difficile. Lors de cette mise au point, nous avons optimisé les concentrations en MgCl₂, les températures d'hybridation des oligonucléotides et validé le nombre de cycles de PCR requis pour vérifier la linéarité de l'étape d'amplification.

L'analyse de l'expression du transcrite EXT1 dans les cellules de chondrosarcome ne montre pas de modification après traitement à la 5-Aza-dc (Figures 4A et 4C, publication n°1). Ce résultat est en accord avec le faible taux de méthylation de ce gène dans les cellules HEMC (Figure 1, publication n°1). Par contre, on assiste à une induction de l'expression des transcrits codés par les gènes *NDST1*, *HS6ST2* après traitement à la 5-Aza-dc, ce qui suggère l'implication d'une régulation épigénétique de leur expression (Figures 4A et 4C, publication n°1). Enfin, l'analyse de l'effet du traitement 5-Aza-dc sur les taux de transcrits des 3-OSTs dans les cellules HEMC montre une augmentation significative d'expression pour les gènes *3-OST1*, *-2* et *-3A* dans les cellules traitées (Figures 4B et 4D, publication n°1). Ce résultat est également en accord avec les forts taux de méthylation relevés pour ces gènes.

Les résultats obtenus indiquent que ce traitement entraîne une induction d'expression des STs 3-OST3A (d'un facteur 2.7) et de façon moindre des 3-OST1 et -2 (d'un facteur 1.5).

Dans le but de déterminer par quel mécanisme la 5-Aza-dc induit l'expression de ces gènes, nous avons analysé la méthylation de la séquence promotrice proximale et du premier exon des gènes qui présentaient de fortes augmentations de leur taux d'expression après traitement à la 5-Aza-dc (*NDST1*, *HS6ST2* et *3-OST3A*). Le séquençage de ces régions a permis de vérifier que la méthylation de l'ADN pour ces gènes, était inhibée respectivement de 30%, 35% et 54% dans les cellules traitées (Figure 1, Annexe, publication n°1). Ainsi, l'induction de l'expression des gènes hyperméthylés observée peut être attribuée, du moins en partie, à une déméthylation des régions promotrices consécutive au traitement à la 5-Aza-dc.

I.3 Analyses qualitatives et quantitatives des PGs cellulaires après traitement à la 5-Aza-dc

Après confirmation de l'induction de l'expression des gènes impliqués dans la sulfatation des HS, nous avons analysé les conséquences fonctionnelles de leur altération et de leur réexpression par la 5-Aza-dc dans les cellules HEMC. Pour ce faire, nous avons adapté au laboratoire plusieurs techniques d'analyse des PGs cellulaires et matriciels. Nous avons dans un premier temps récupéré les fractions contenant les macromolécules radiomarquées au ³⁵S

en filtrant les milieux de culture et lysats cellulaires sur une résine Sephadex G-50. Cette étape de dessalage est nécessaire afin d'éliminer la radioactivité non incorporée.

Nous avons dans un second temps, réalisé une analyse par électrophorèse en gel dénaturant, des PGs cellulaires et matriciels radiomarqués de chondrocytes d'origine humaine et de chondrosarcome. Les résultats obtenus par séparation sur gel ne permettant pas une analyse quantitative des PGs totaux produits, nous avons approfondi notre étude en utilisant deux techniques chromatographiques afin d'évaluer la charge globale des PGs par chromatographie échangeuse d'anions d'une part, et la longueur des chaînes de GAG par chromatographie d'exclusion stérique (ou gel filtration) d'autre part.

I.3.1 Analyse du contenu en PGs de chondrocytes et de cellules HEMC par SDS-PAGE

L'analyse par SDS-PAGE des PGs après radiomarquage au ^{35}S , permet de visualiser les PGs sulfatés. Nous avons réalisé un gel de PGs cellulaires et excrétés des cellules HEMC et de chondrocytes humains afin de comparer leur contenu en chaînes de GAG.

D'après la Figure 19, on remarque la présence d'une bande intense et majoritaire au niveau des pistes 1 et 2 correspondant respectivement aux PGs totaux non digérés et aux PGs résistants à la digestion à l'héparinase I. Par contre, cette bande résistante disparaît complètement après digestion à la chondroïtinase ABC. Nous pouvons donc en conclure que les chondrocytes humains excrètent de façon majoritaire des PGs à CS de masse moléculaire (MM) > 220 kDa dans le milieu de culture. Ces PGs correspondent vraisemblablement à de l'agrécan, qui représente le PG majoritaire produit par ce type cellulaire.

Par contre, les pistes correspondant aux fractions cellulaires contiendraient également des PGs à CS de plus petite taille et nettement moins sulfatés.

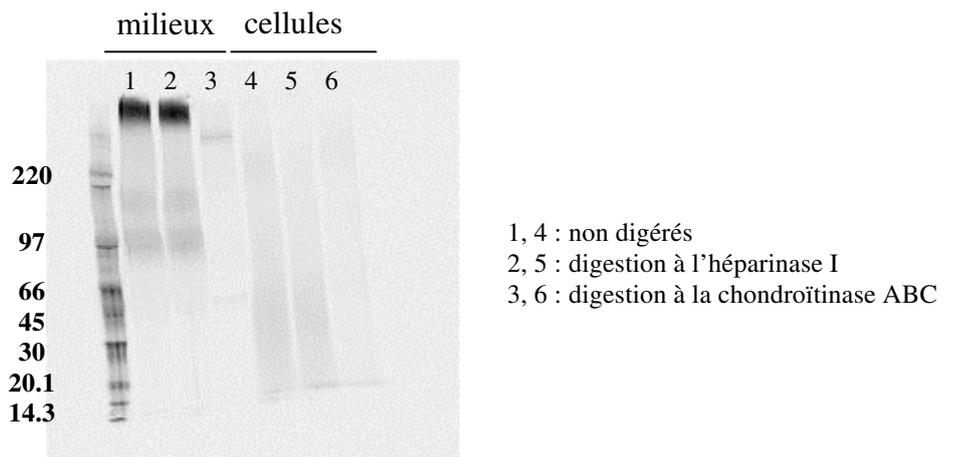


Figure 19 : Gel SDS-PAGE des PGs cellulaires et excrétés de chondrocytes

Les chondrocytes en culture sont radiomarqués en présence de ^{35}S durant 22 h puis les milieux et les lysats cellulaires sont récoltés et déposés sur colonne Sephadex G-50 afin d'éliminer la radioactivité non incorporée. Les macromolécules radiomarquées présentes dans les éluats sont laissées intactes ou sont digérées par l'héparinase I ou par la chondroïtinase ABC. Les PGs totaux et digérés sont analysés par SDS-PAGE, le gel est ensuite mis à sécher et exposé sur un film photosensible. Chaque piste correspond à un dépôt d'environ 20 000 cpm. Les bandes correspondant aux différentes masses moléculaires (en kDa) du marqueur radiomarqué au ^{14}C sont annotées à gauche du gel.

Nous avons ensuite analysé le contenu en PGs des cellules de chondrosarcome HEMC présenté en Figure 20. Contrairement aux chondrocytes, on constate que les cellules HEMC synthétisent essentiellement des PGs à HS détectés dans le milieu de culture et les fractions cellulaires. La masse des PGs à HS s'étend de 97 kDa à plus de 220 kDa pour les milieux de culture et à plus de 220 kDa dans les lysats cellulaires.

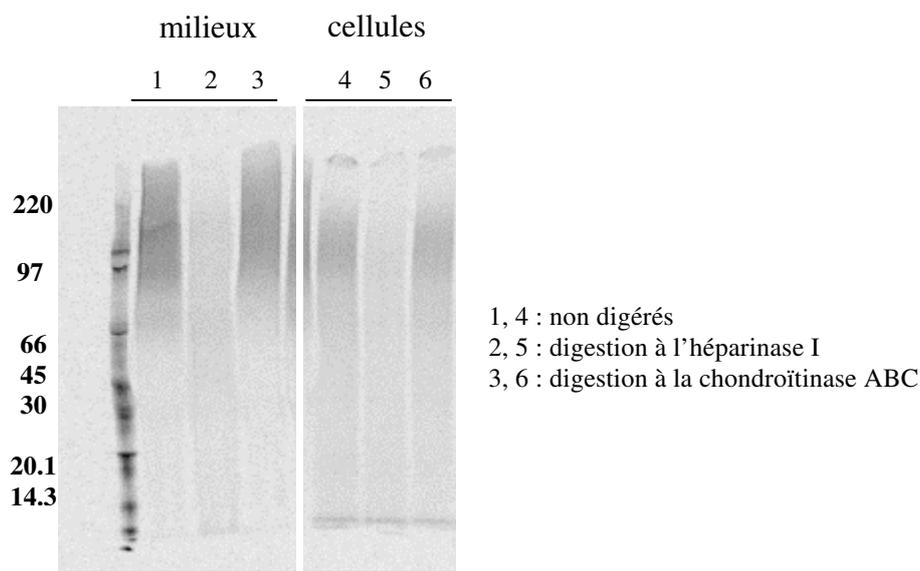


Figure 20 : Gel SDS-PAGE des PGs cellulaires et excrétés de cellules HEMC

Les cellules HEMC en culture sont radiomarquées en présence de ^{35}S durant 22 h puis les milieux et les lysats cellulaires sont récoltés et déposés sur colonne Sephadex G-50 afin d'éliminer la radioactivité non incorporée. Les macromolécules radiomarquées présentes dans les éluats sont laissées intactes ou sont digérées par l'héparinase I ou par la chondroïtinase ABC. Les PGs totaux et digérés sont analysés par SDS-PAGE, le gel est ensuite mis à sécher et exposé sur un film photosensible. Chaque piste correspond à un dépôt d'environ 20 000 cpm. Les bandes correspondant aux différentes masses moléculaires (en kDa) du marqueur radiomarqué au ^{14}C sont annotées à gauche du gel.

De façon intéressante, on remarque que les deux types cellulaires testés produisent des PGs de nature et de taille très différentes. L'analyse en SDS-PAGE met en évidence des PGs à HS dans les cellules HEMC dont l'implication potentielle dans les processus de cancérogenèse fera l'objet de nos études ultérieures.

I.3.2 Analyse des PGs cellulaires par chromatographie échangeuse d'anions et chromatographie d'exclusion stérique

La technique de chromatographie échangeuse d'anions mise en œuvre nous a permis de comparer la sulfatation des PGs à HS cellulaires issus de cellules non traitées et traitées à la 5-Aza-dc afin de juger de l'impact de l'altération du profil d'expression des gènes hyperméthylés sur la composition des chaînes de HS. Après dépôt sur colonne des extraits cellulaires digérés à la chondroïtinase ABC, l'application d'un gradient de NaCl sur la résine de DEAE a permis d'éluer les molécules en fonction de leur charge, les espèces les plus chargées étant éluées plus tardivement. On observe sur le chromatogramme que le point de

sortie du pic correspondant aux PGs à HS est décalé vers la droite dans le cas des cellules traitées, suggérant une charge plus forte de ces derniers (Figure 5A, publication n°1).

Cette augmentation de la charge après traitement peut s'expliquer par trois facteurs : (1) une production plus importante de PGs, (2) une augmentation de la charge due à la présence accrue de groupements sulfates, et/ou (3) une augmentation de la longueur des chaînes de HS. Dans le but de tester ces hypothèses, nous avons réalisé une analyse des PGs cellulaires par chromatographie d'exclusion stérique dont le principe est de séparer les chaînes de HS en fonction de leur taille. Pour ce faire, un double radiomarquage des cellules HEMC par du Na_2SO_4 [^{35}S] et de la GlcN [^3H] est nécessaire pour suivre simultanément la sulfatation et la formation des chaînes de HS, respectivement. De plus, une digestion préalable à la protéinase K permet de libérer les chaînes de GAG. L'interprétation des résultats est possible après calcul du ratio $^{35}\text{S}/^3\text{H}$, qui montre que le traitement 5-Aza-dc modifie essentiellement le degré de sulfatation des chaînes de HS alors que la taille n'est pas changée comme le montre l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique (Figure 5C, publication n°1).

De plus, la possibilité d'une production accrue des PGs à l'origine d'une augmentation de la charge observée après traitement à la 5-Aza-dc a été éliminée en réalisant un radiomarquage des cellules avec un cocktail contenant de la cystéine et de la méthionine radiomarquées au ^{35}S . La superposition des deux chromatogrammes obtenus pour les cellules traitées et non traitées (Figure 5B, publication n°1) montre des profils d'élution similaires et exclut l'hypothèse d'une augmentation majeure de synthèse de la protéine « core ».

I.4 Analyse des PGs après transfection transitoire par les plasmides pcDNA-3OST1HA ou pcDNA-3OST3AHA par chromatographie échangeuse d'anions

Dans le but de déterminer si l'induction d'expression des gènes de la famille des 3-OSTs contribue à une augmentation de la sulfatation des HS cellulaires, nous avons réalisé des transfections transitoires des ADNc correspondant aux gènes présentant une méthylation aberrante et une induction importante (3-OST3A) ou modérée (3-OST1) des transcrits correspondant, dans les cellules traitées. Nous avons choisi de cloner les ADNc codant chacune de ces deux enzymes car leur région promotrice présente des profils d'hyperméthylation spécifiquement dans les cellules HEMC, par rapport à des cellules sanguines utilisées comme contrôle.

Les cellules HEMC sont transfectées de façon transitoire avec les plasmides codant la 3-OST1, la 3-OST3A ou le plasmide vide (contrôle). Cette stratégie a l'avantage de cibler précisément

le rôle des 3-OST1 et la 3-OST3A et permet d'évaluer l'effet de leur surexpression sur le comportement des cellules.

Après transfection, l'expression des deux enzymes recombinantes humaines dans les cellules HEMC a été vérifiée au moyen d'anticorps anti-HA couplé au FITC au cours des analyses en immunofluorescence (Figures 6H et 6I publication n°1).

Nous avons également analysé la sulfatation des HS dans les cellules transfectées par les plasmides pcDNA-3OST1HA et pcDNA-3OST3AHA. Pour ce faire, nous avons traité les extraits cellulaires par la chondroïtinase ABC et analysé les échantillons par chromatographie échangeuse d'anions. Les chromatogrammes obtenus montrent que le pic correspondant aux HS extraits de cellules surexprimant la 3-OST1 est retardé, indiquant une quantité plus importante de PGs à HS cellulaires et/ou plus chargés. De façon comparable, on remarque que les cellules surexprimant la 3-OST3A synthétisent des PGs à HS cellulaires encore plus chargés car le pic correspondant se trouve nettement décalé par rapport à celui correspondant au contrôle (Figure 21).

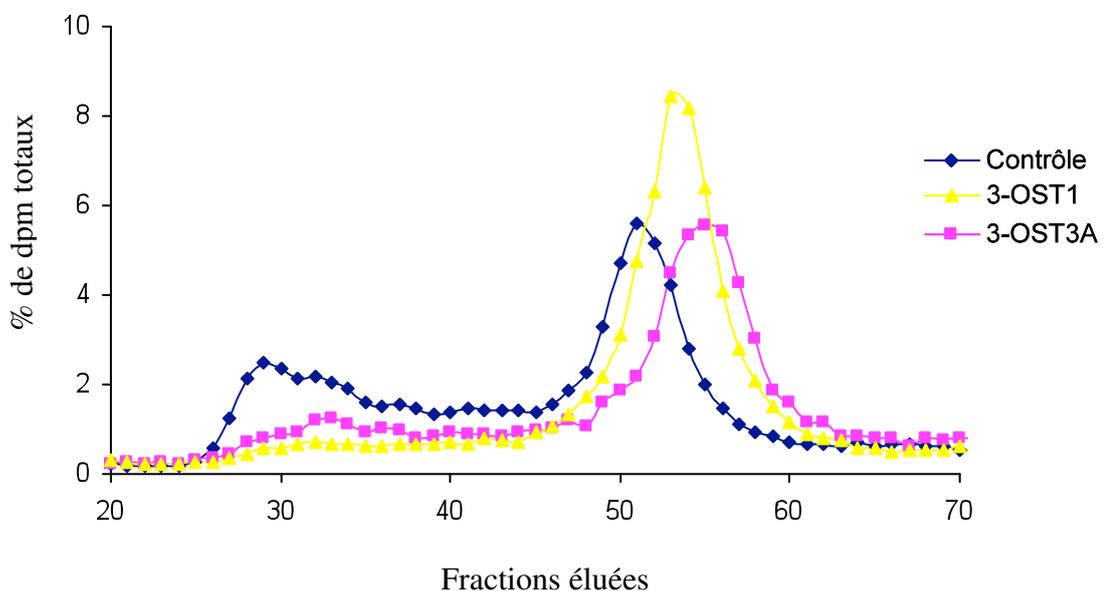


Figure 21 : Chromatogramme des PGs à HS cellulaires après surexpression des 3-OST1 et 3-OST3A dans les cellules HEMC

Les éluats de colonne Sephadex G-50 contenant les macromolécules radiomarquées sont digérés durant 3 h par la chondroïtinase ABC. Le produit de digestion est déposé sur une résine de DEAE puis un gradient de NaCl est appliqué (0.05-0.08M) pour permettre l'élution des macromolécules chargées négativement. Les fractions d'un volume de 1 ml sont collectées et la radioactivité associée est mesurée par comptage à scintillation liquide.

Les cellules traitées à la 5-Aza-dc ou transfectées feront l'objet d'une analyse biochimique du contenu en PGs cellulaires d'une part, et de tests cellulaires d'autre part afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles de l'induction ou de la surexpression des gènes *3-OST1* et *3-OST3A* dans les cellules HEMC.

I.5 Analyse en immunofluorescence indirecte des cellules traitées à la 5-Aza-dc et transfectées par les plasmides pcDNA-3OST1HA ou pcDNA-3OST3AHA

Les analyses en immunofluorescence au moyen d'anticorps anti-HS permettent de visualiser les chaînes de HS cellulaires présents à la surface des cellules HEMC.

Les cellules non traitées ou transfectées par le plasmide vide présentent un marquage discret correspondant aux chaînes de HS au niveau de la surface cellulaire (Figures 6A et 6D, publication n°1). Le traitement à la 5-Aza-dc ainsi que la transfection des cellules par les plasmides pcDNA-3OST1HA ou pcDNA-3OST3AHA se traduisent par un marquage péricellulaire de forte intensité correspondant aux chaînes de HS cellulaires, suggérant une expression accrue de l'épitope reconnu par l'anticorps anti-HS (10E4), au niveau de la surface des cellules traitées ou transfectées (Figures 6B, 6E, et 6F, publication n°1). L'ensemble de ces résultats nous permet de dire que le traitement des cellules HEMC ou la surexpression de la *3-OST1* ou *3-OST3A* permet la restauration de l'expression de HS membranaires dont les épitopes contenant la GlcNS 3-*O*-sulfatée sont reconnus par l'anticorps anti-HS utilisé.

Dans la suite de nos travaux, nous avons cherché à déterminer si le changement de profil d'expression des HS cellulaires était capable d'influencer le comportement des cellules HEMC et plus particulièrement leurs propriétés invasives.

I.6 Conséquences fonctionnelles du traitement 5-Aza-dc ou de la surexpression des *3-OST1* ou *3-OST3A* dans les cellules HEMC

Dans le but d'évaluer les conséquences fonctionnelles du traitement à la 5-Aza-dc ou de la surexpression de la *3-OST1* ou de la *3-OST3A* sur le comportement cellulaire, nous avons mis au point une série de tests cellulaires regroupant la prolifération, l'adhésion et la motilité.

Nous avons dans un premier temps mis en place un test de prolifération et d'invasion cellulaire appelé « wound healing » afin d'étudier les capacités prolifératives et invasives des cellules HEMC par visualisation de la vitesse de comblement d'une brèche générée au niveau du tapis cellulaire.

Ce test a permis de mettre en évidence le caractère agressif des cellules de chondrosarcome HEMC. Nous avons établi une lignée de cellules exprimant la *3-OST1* et avons analysé leur

capacité à refermer la cicatrice aux temps 0, 4, 8 et 12 h. La Figure 22 montre un comblement quasi-complet de la brèche par les cellules environnantes au temps T12 pour les cellules « contrôles » alors que le comblement de la brèche dans le cas de la lignée 3-OST1 n'a atteint que 61%. Il apparaît donc que les cellules issues de la lignée stable exprimant la 3-OST1 ont un pouvoir invasif inférieur à celui des cellules HEMC « contrôles ».

Nous n'avons pas pu réaliser la même étude avec la lignée cellulaire surexprimant de manière stable la 3-OST3A car les cellules présentaient une prolifération cellulaire très ralentie.

La quantification des espaces comblés par les cellules a été réalisée avec le logiciel Image J et les valeurs sont mentionnées dans le Tableau 11.

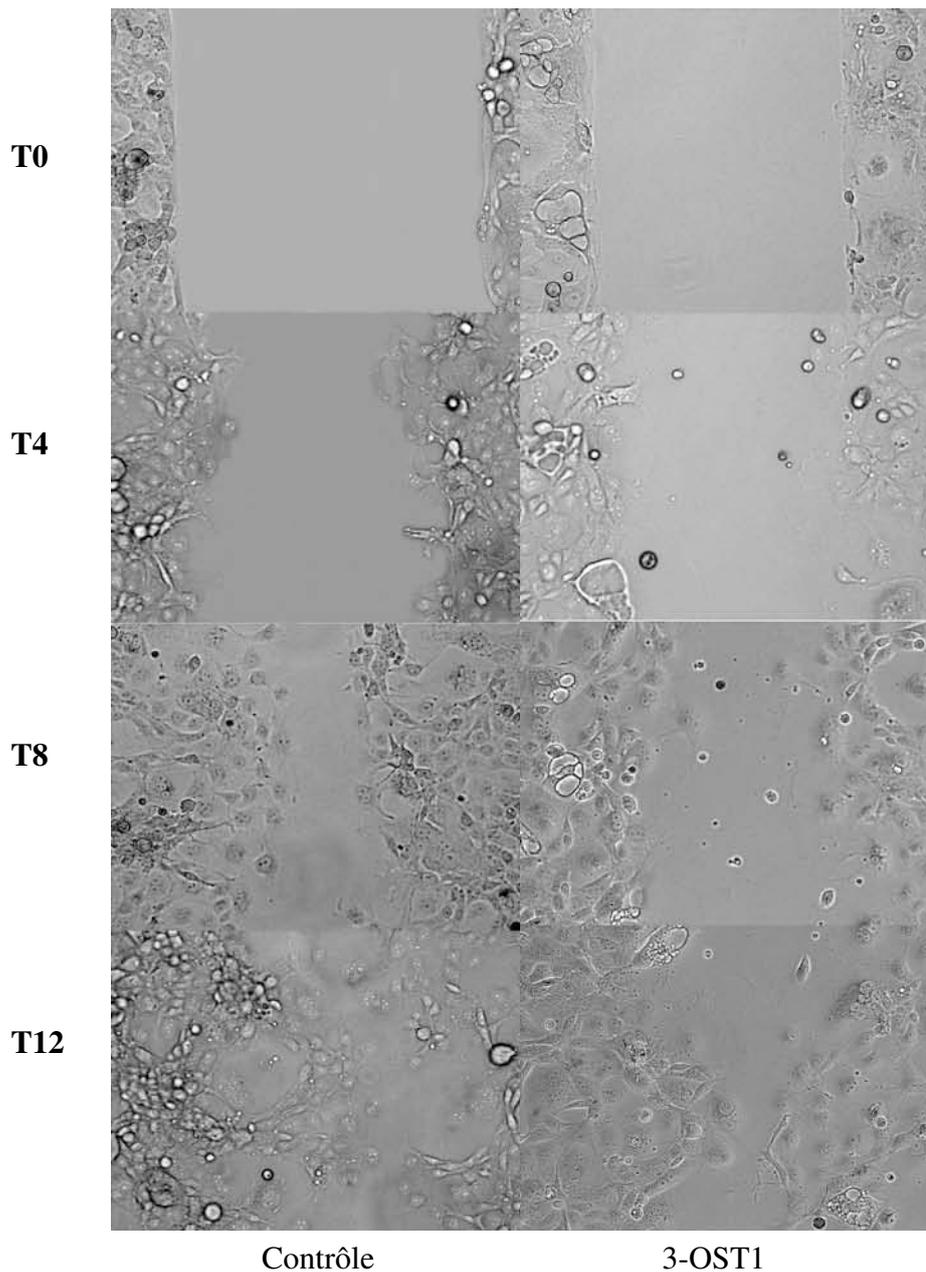


Figure 22 : Cinétique de prolifération et de migration des cellules HEMC et d'une lignée de cellules HEMC surexprimant de manière stable la 3-OST1

Les photos présentées ont été prises à quatre temps différents (T0, T4, T8 et T12) et permettent de suivre le phénomène d'invasion cellulaire des cellules HEMC et de la lignée stable de 3-OST1 après création d'une cicatrice au niveau du tapis cellulaire.

% espace comblé	Contrôle	3-OST1
T0	0	0
T4	34,5	14,3
T8	71,8	33,7
T12	-	61,1

Tableau 11 : Quantification du pourcentage des aires non occupées par les cellules HEMC

La quantification est réalisée à partir des photos prises en Figure 22 avec l'aide du logiciel Image J.

Le test de « wound healing » n'a pas pu être utilisé pour la suite de nos travaux car les différences observées sont difficilement quantifiables dans le cadre de transfections transitoires et il s'est avéré que l'expression des enzymes recombinantes dans les lignées stables diminuait au fur-et-à-mesure des passages.

Nous avons ensuite mis au point trois tests cellulaires renseignant sur la prolifération par mesure de l'ADN cellulaire par fluorimétrie, l'adhésion cellulaire dans des puits recouverts de fibronectine et la migration *in vitro* en chambre de Boyden. Nous avons mené une étude comparative de ces trois paramètres pour les cellules traitées et transfectées par les plasmides pcDNA-3OST1HA ou pcDNA-3OST3AHA avec leur contrôle correspondant.

Ainsi, la 5-Aza-dc exerce un effet inhibiteur puissant sur la prolifération des cellules HEMC car on note une diminution de la prolifération cellulaire de l'ordre de 45% après 5 jours de traitement (Figure 7A, publication n°1). Une réduction de la prolifération cellulaire de l'ordre de 20% est également observée dans le cas des cellules transfectées par la 3-OST3A (Figure 7B, publication n°1) alors que la transfection par la 3-OST1 ne produit pas d'effets significatifs.

Nous avons ensuite testé l'effet du traitement 5-Aza-dc et des transfections sur les capacités d'adhésion des cellules HEMC avec comme ligand la fibronectine. Nous constatons que les cellules traitées à la 5-Aza-dc pour la dose de 200 µg de fibronectine, présentent une augmentation significative de leur capacité d'adhésion (Figure 7C, publication n°1). De façon intéressante, cet effet est amplifié de manière dose-dépendante lorsque les cellules sont transfectées avec le plasmide pcDNA-3OST3AHA. On note un pourcentage de cellules adhérentes jusqu'à 65% supérieur à celui du contrôle correspondant (Figure 7D, publication

n°1). Cependant, aucun effet significatif dans le cas des cellules transfectées avec le vecteur pcDNA-3OST1HA n'a été relevé.

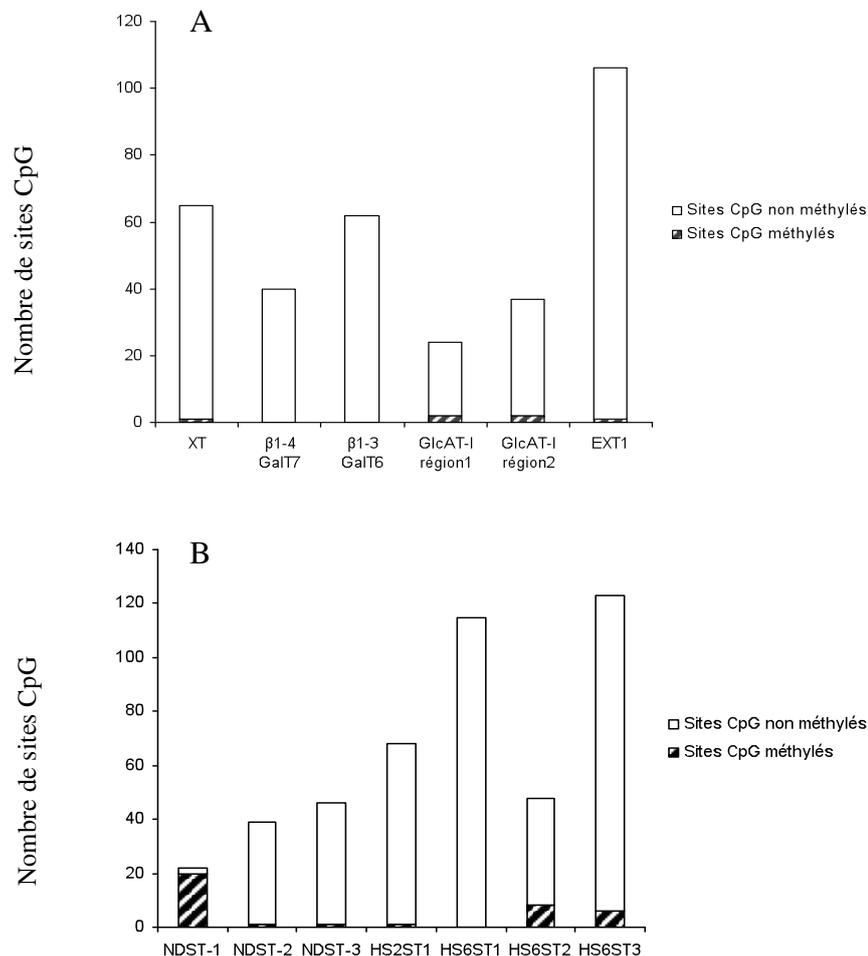
Nous avons terminé notre étude en testant les capacités de migration des cellules HEMC en utilisant des nacelles pourvues d'une membrane de polycarbonate poreuse au travers de laquelle les cellules peuvent migrer. Nous avons confirmé que les cellules HEMC étaient dotées d'un fort pouvoir invasif car elles peuvent atteindre un taux de migration de 50% alors que les cellules traitées montrent au contraire un pouvoir migratoire diminué aux temps 8, 16 et 24 h (Figure 7E, publication n°1). Nous avons ensuite analysé les conséquences des transfections sur la motilité cellulaire. La surexpression de la 3-OST1 ou de la 3-OST3A dans les cellules HEMC réduit leur motilité de 22% à 15% respectivement comparativement au contrôle. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les modifications des chaînes de HS après surexpression des enzymes 3-OST1 et 3-OST3A sont impliquées dans le caractère invasif des cellules HEMC.

I.7 Etablissement des cartes de méthylation des GTs et 3-OSTs dans les cellules de chondrosarcome humain SW 1353

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la survenue de ce type de tumeur, nous nous sommes intéressés à une seconde lignée de chondrosarcome SW 1353 et utilisé la même démarche que précédemment afin de comparer les profils de méthylation des gènes impliqués dans la biosynthèse et la modification des PGs à HS.

Les résultats obtenus dans cette lignée cellulaire montrent comme dans le cas des cellules HEMC, que les gènes codant les GTs ne sont pas soumis à une régulation épigénétique *via* la méthylation de l'ADN car très peu de sites CpG sont méthylés au niveau de leur région promotrice (Figure 23A). Par contre, les régions promotrices des gènes *NDST1* et *3-OST1* sont également hyperméthylés dans les cellules SW 1353 avec respectivement 91% et 31% de sites méthylés. On retrouve une méthylation modérée des gènes *HS6ST2*, *HS6ST3* et *3-OST6* dans les cellules SW 1353 (Figures 23B et 23C). Par contre, le gène *3-OST3A* ne présente pas de méthylation aberrante au niveau de sa région promotrice (Figure 23C). De manière générale, l'établissement des profils de méthylation des gènes 3-OSTs indique que la méthylation des gènes étudiés est plus modérée. Ceci souligne donc l'importance du gène *3-OST3A* dans la lignée cellulaire HEMC étudiée et justifie l'étude approfondie de cette isoforme et de l'impact de la modification qu'elle catalyse dans le comportement invasif des cellules HEMC. Enfin, des tests cellulaires préliminaires montrent que les cellules SW 1353 ne présentent pas le même comportement que les cellules HEMC en terme de capacité

d'adhésion notamment. De plus, leur morphologie est différente des cellules HEMC car elles présentent un aspect nettement plus fibroblastique. Le taux des transcrits 3-OST1 et 3-OST3A étant plus élevé que dans les cellules HEMC, nous avons mis en œuvre des travaux complémentaires visant à éteindre spécifiquement l'expression de ces deux transcrits au moyen de siRNA dans le but de d'étudier les conséquences de leur répression dans la lignée de chondrosarcome SW 1353 sur le comportement cellulaire.



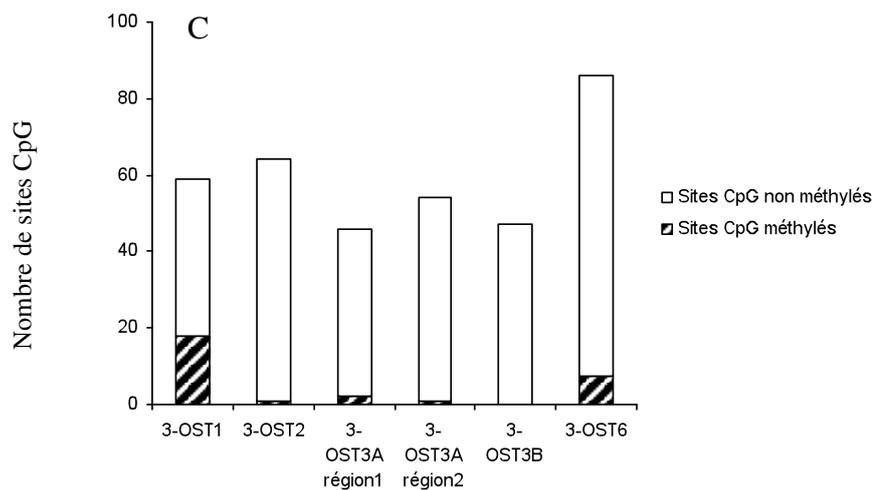


Figure 23 : Profils de méthylation des GTs et des STs impliquées dans les voies de biosynthèse et de modification des PGs à HS dans les cellules SW 1353

Les zones hachurées correspondent au nombre de sites CpG méthylés.

II EXPLORATION DU RÔLE DES 3-OSTs SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE DANS UNE LIGNÉE CELLULAIRE D'ADÉNOCARCINOME DU SEIN MCF7.

L'étude réalisée sur les lignées de chondrosarcome ayant mis en évidence l'importance des 3-OSTs et de la sulfatation en position 3 des résidus GlcNS des HS, nous avons initié une étude sur le rôle de cette sous-famille de STs dans le comportement cellulaire d'une autre lignée tumorale provenant de tissus épithéliaux. Nous avons orienté notre choix vers la lignée d'adénocarcinome du sein MCF7 car de récents travaux mettent en évidence une hyperméthylation du gène *3-OST2* dans cette lignée cellulaire (Miyamoto et al., 2003). Nous espérons que ces travaux apporteront une connaissance plus générale des mécanismes moléculaires qui participent au processus de cancérogenèse et notamment du rôle des PGs à HS.

Cette étude est présentée sous la forme d'une publication en préparation :

Aberrant DNA methylation of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase gene in MCF7 breast cancer cells

Catherine Bui, Michael W.H. Coughtrie, Ibtissam Talhaoui, Narayanan Venkatesan, Mohamed Ouzzine and Sylvie Fournel-Gigleux.

(en préparation)

II.1 Cartographie de méthylation des gènes *3-OST* dans les cellules MCF7

Dans une approche comparable à celle mise en œuvre pour les cellules HEMC, nous avons établi les profils de méthylation des gènes codant la sous-famille des 3-OSTs dans les cellules d'adénocarcinome de sein MCF7. Ainsi, nous avons mis en évidence une hyperméthylation touchant les gènes *3-OST2* et *-3A* au niveau de leur région promotrice proximale et du premier exon dans les cellules MCF7 (Figure 1, publication n°2). Nous avons également relevé une méthylation modérée de la région promotrice du gène *3-OST1* dans cette lignée cellulaire.

De façon comparable, le traitement 5-Aza-dc a permis d'augmenter de façon significative le taux d'expression des gènes *3-OST1* et *3-OST3A* et de façon moindre celui de la *3-OST2*, confirmant ainsi l'implication d'une régulation par méthylation de l'ADN dans ces cellules (Figure 2, publication n°2). Par contre, l'isoforme *3-OST3B* ne présente pas de modifications de son taux d'expression dans les cellules traitées. Ce résultat est en accord avec l'absence de sites CpG méthylés mis en évidence par l'établissement de sa carte de méthylation (Figure 1, publication n°2).

II.2 Analyse des PGs cellulaires et excrétés des cellules MCF7

Le gel SDS-PAGE (Figure 24) nous renseigne sur la nature et le taux de sulfatation des PGs produits par les cellules MCF7. Ainsi, si l'on compare les puits 1-2-3, on remarque que les MCF7 excrètent essentiellement des PGs à HS car le profil de migration entre les puits correspondant respectivement aux PGs totaux et à ceux résistants à la digestion à la chondroïtinase ABC est tout à fait comparable. La masse moléculaire des PGs produits varie de 66 kDa à plus de 220 kDa. Par contre, on note une différence du profil de migration entre les puits 1 et 4 correspondant respectivement aux PGs totaux produits par des cellules non traitées (contrôle) et traitées à la 5-Aza-dc. Ce résultat suggère que le traitement à la 5-Aza-dc a modifié le profil de sulfatation des PGs à HS des cellules MCF7 et favoriserait la sulfatation de PGs à HS d'une masse moléculaire d'environ 66 kDa.

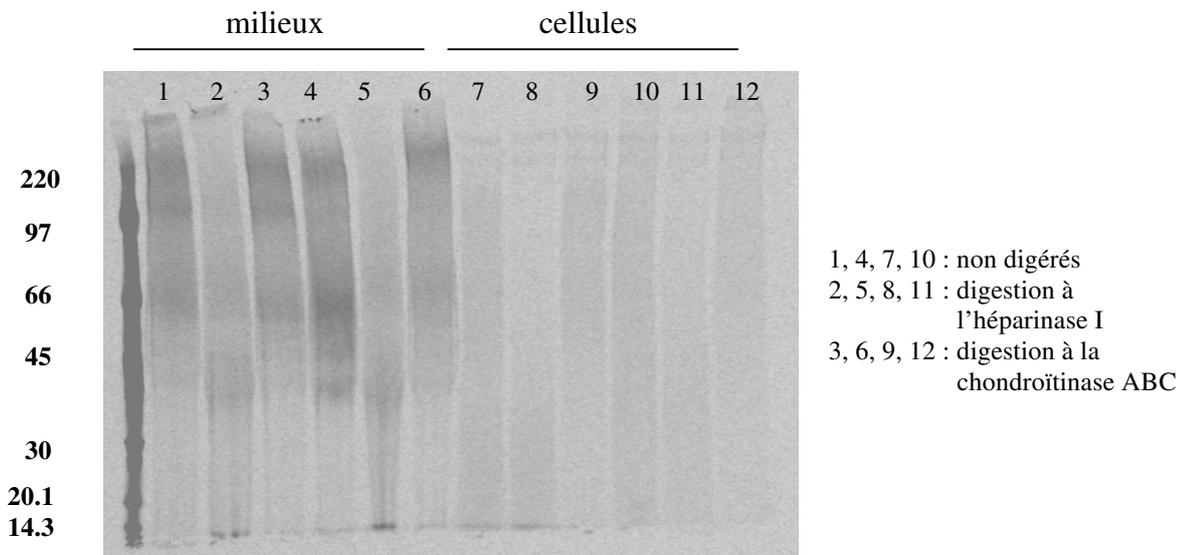


Figure 24 : Gel SDS-PAGE des PGs cellulaires et excrétés de cellules MCF7

Après 7 jours de traitement, les cellules MCF7 sont radiomarquées en présence de ^{35}S durant 22 h puis les milieux de culture et les lysats cellulaires sont récoltés et passés sur colonne Sephadex G-50 afin d'éliminer la radioactivité non incorporée. Les macromolécules radiomarquées présentes dans les éluats sont laissées intactes ou sont digérées par la chondroïtinase ABC ou l'héparinase I. Les PGs totaux et digérés sont analysés par SDS-PAGE, le gel est ensuite mis à sécher et exposé sur un film photosensible. Chaque piste correspond à un dépôt d'environ 20 000 cpm. Les bandes correspondant aux différentes masses moléculaires (en kDa) du marqueur radiomarqué au ^{14}C sont annotées à gauche du gel.

II.3 Conséquences fonctionnelles de la surexpression des gènes *3-OST1* et *3-OST3A* dans les cellules MCF7

Afin d'explorer le rôle potentiel de la 3-O-sulfatation sur le comportement sur cette lignée cellulaire, nous avons transfecté les cellules MCF7 avec les plasmides codant les pcDNA-

3OST1HA ou pcDNA-3OST3AHA car les taux d'expression de ces deux gènes étaient induits de façon importante après traitement des cellules MCF7 à la 5-Aza-dc.

Sachant que la composition et la structure des chaînes de HS cellulaires gouvernent leur spécificité d'interaction avec de nombreux facteurs de croissance (notamment de la famille des FGFs), nous avons également initié des travaux afin de déterminer si ce type de facteur de croissance pourrait être impliqué dans l'activation de gènes responsables d'un ralentissement de la prolifération cellulaire dans des cellules MCF7 surexprimant les 3-OST1 et -3A.

II.3.1 Etude de l'activation de la voie des MAPK médiée par les chaînes de HS cellulaires

Les récepteurs des FGFs appelés FGFR font partie de la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase. L'identification des chaînes de HS ou Hep comme une composante essentielle à la formation du complexe FGF/FGFR au niveau membranaire suggère que l'activité des FGFs et leur spécificité d'interaction peuvent être modulées par la composition des chaînes de HS et par conséquent, par les enzymes responsables de leur synthèse et dégradation (Ornitz, 2000). De plus, des travaux réalisés par Ye et al. (2001) indiquent que le FGF-7 reconnaît de façon spécifique la 3-*O*-sulfatation présente sur les chaînes de HS et faciliterait la formation du complexe ternaire HS/FGF/FGFR, responsable de l'activation des voies de signalisation cellulaire. Dans ce contexte, nous avons testé si le FGF-7 était capable d'induire la voie des MAPK conduisant à une phosphorylation de la protéine p44/42 ou la protéine p38 dans les cellules MCF7. Afin de déterminer la spécificité d'interaction éventuelle entre les motifs 3-*O*-sulfatés des HS, le récepteur FGFR et le FGF-7, nous avons transfecté les cellules MCF7 avec les vecteurs codant les STs 3-OST1 ou -3A dans le but d'augmenter la 3-*O*-sulfatation des HS cellulaires.

Pour ce faire, 48 h après transfection, les cellules sont placées en milieu déplété (0% de SVF) durant une nuit dans le but d'inactiver les voies de signalisation cellulaire induites par les facteurs de croissance présents dans le SVF. Puis, les cellules sont traitées le lendemain avec du milieu contenant 1 ng/ml de FGF-7 durant 10 min.

Nous avons réalisé des immunoblots avec les anticorps anti-Phospho-p44/42 et anti-Phospho-p38. Nous avons uniquement fait figurer dans cette partie, que les immunoblots réalisés avec les anticorps anti-Phospho-p44/42 et anti-p44/42 car nous n'avons pas pu détecter de protéines p38 sous forme phosphorylée dans les cellules MCF7 dans les conditions utilisées.

D'après la Figure 25, on note que la surexpression des 3-OSTs combinée au traitement des cellules par le FGF-7 semble augmenter la phosphorylation de la protéine p44/42 (pistes 2 et 4). Ces travaux suggèrent que le FGF-7 *via* une interaction avec le motif 3-*O*-sulfate des

chaînes de HS pourrait potentialiser la voie des MAPK. Ces résultats constituent une piste intéressante mais nécessitent néanmoins une investigation plus approfondie.

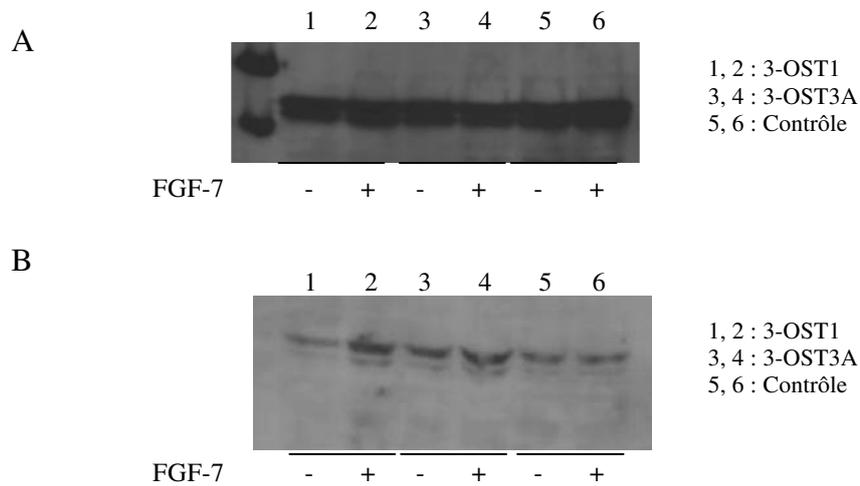


Figure 25 : Analyse par immunoblot des protéines p44/42 (MAPK) et Phospho-p44/42 (MAPK) dans les cellules MCF7

Les cellules MCF7 sont transfectées par les plasmides pcDNA3-OST1HA ou pcDNA3-OST3AHA dans les mêmes conditions que précédemment décrites. 48 h après transfection, les cellules MCF7 sont placées en milieu déplété (0% de SVF) durant une nuit et traitées le lendemain avec un milieu réduit supplémenté avec 1 ng/ml de FGF-7. 60µg de protéines totales sont déposées par puits. Les anticorps utilisés sont dirigés contre la forme non phosphorylée (A) et phosphorylée (B) de la protéine p44/42.

II.3.2 Conséquences fonctionnelles de la surexpression des 3-OST1 et 3-OST3A sur la prolifération cellulaire

Afin d'explorer les conséquences fonctionnelles de la surexpression des 3-OST1 et -3A dans le comportement cellulaire, nous avons transfecté de façon transitoire les cellules MCF7 avec les plasmides codant les pcDNA-3OST1HA, pcDNA-3OST3AHA ou le vecteur vide. Nous avons mesuré la concentration en ADN (µg/ml) durant cinq jours afin de suivre la prolifération cellulaire.

De façon significative, le traitement à la 5-Aza-dc ralentit très fortement la prolifération des cellules MCF7 (Figure 3A, publication n°2).

Les résultats obtenus suite à la surexpression des 3-OST1 ou -3A montrent une diminution importante de la prolifération des cellules transfectées par les deux gènes, suggérant l'importance de cette modification dans la prolifération et potentiellement dans le processus tumoral (Figure 3B, publication n°2).

III ETUDES FONCTIONNELLES ET STRUCTURALES DE LA β 4GalT7 RECOMBINANTE HUMAINE : ROLE DES MOTIFS D¹⁶³VD¹⁶⁵ ET ²²¹FWGWGREDDE²³⁰ DANS LA LIAISON DU SUBSTRAT DONNEUR UDP-GAL ET DU COFACTEUR METALLIQUE

Un aspect complémentaire de ma thèse a porté sur l'étude fonctionnelle et structurale des GTs qui catalysent les étapes initiales des voies de biosynthèse des PGs. Mes travaux ont essentiellement été consacrés à la β 4GalT7. Ils ont pour but de mieux comprendre le fonctionnement de cette enzyme et de mettre en évidence les acides aminés importants dans la reconnaissance des substrats accepteur et donneur et/ou impliqués dans la catalyse enzymatique. Pour ce faire, nous avons réalisé une série de mutations conservatives et non conservatives de l'enzyme sauvage recombinante au niveau de régions hautement conservées au sein des β 4GalTs afin d'évaluer leur impact sur les propriétés fonctionnelles et cinétiques de l'enzyme par des analyses *in vitro*. De façon complémentaire, des études menées *ex vivo* dans les cellules en culture ont permis d'analyser les conséquences fonctionnelles des mutations de la β 4GalT7 sur l'initiation et la biosynthèse des PGs dans la lignée CHO pgsB-618 déficiente en β 4GalT7.

Ce travail est présenté sous la forme d'une deuxième publication en préparation :

Structure-function studies of human β 1, 4-galactosyltransferase 7 (β 4GalT7) : identification of key residues in substrate binding and catalysis.

Ibtissam Talhaoui, Catherine Bui, Sandrine Gulberti, Rafael Oriol, Guillermo Mulliert, Patrick Netter, Jacques Magdalou, Mohamed Ouzzine and Sylvie Fournel-Gigleux.

(en préparation)

III.1 Analyse phylogénétique de la famille des β 4GalTs et identification des acides aminés conservés au sein des β 4GalTs

La β 4GalT7 fait partie de la famille des β 1,4 -glycosyltransférases comprenant les sept membres de la famille des β 4GalTs, deux β 1,4 -N-acétylgalactosaminyltransférases (β 4GalNAcT) et quatre chondroïtine synthases (Qasba et al., 2008). L'analyse phylogénétique menée dans ce travail a permis en outre d'identifier 26 séquences apparentées à la β 4GalT7 au sein des bases de données. L'alignement de ces séquences a permis de mettre en évidence deux motifs hautement conservés, le motif « signature » DXD des GTs et la séquence WGXEDD/V/W commune aux « β 4GTs » (Figures 1 et 2, publication n°3).

De façon complémentaire à notre étude, nous avons réalisé une modélisation de la structure 3D de la β 4GalT7 à partir du modèle de la β 4GalT1 bovine (PDB entry 1O0R) afin de prédire quels résidus jouent un rôle dans l'organisation du site actif de l'enzyme. Sur la base de ce modèle, nous avons identifié le motif D¹⁶³VD¹⁶⁵ de la β 4GalT7 et la séquence F²²¹WGWGREDDE²³⁰ localisés au niveau du site actif de l'enzyme, à proximité du substrat donneur. Ces résidus sont représentés dans la Figure 3 (publication n°3).

III.2 Mesure des activités *in vitro* de la β 4GalT7 sauvage et des mutants après expression dans un système d'expression hétérologue eucaryote

Par une approche de mutagenèse dirigée, nous avons évalué le rôle des résidus appartenant à chacun des motifs conservés dans la reconnaissance des substrats donneur et accepteur et/ou la catalyse enzymatique. L'exploration du motif DVD nous a conduits à réaliser une première série de mutants où chaque résidu d'acide aspartique (Asp) du motif D¹⁶³VD¹⁶⁵ est remplacé par une alanine puis un acide glutamique (Glu). Les conséquences des mutations ont été examinées par la mesure de l'activité galactosyltransférase (GalT) *in vitro* et la détermination des paramètres cinétiques apparents pour les mutants qui le permettaient.

Nous avons en premier lieu étudié le rôle des résidus du motif D¹⁶³VD¹⁶⁵ avec l'appui du modèle structural de la β 4GalT7. Les mutations non conservatives des Asp en position 163 ou 165 en Ala abolissent complètement l'activité GalT *in vitro*. Toutefois, le remplacement de l'Asp165 en Glu permet une restauration d'environ 50% de l'activité GalT par rapport à celle de l'enzyme sauvage. De plus, les données obtenues à partir du modèle structural de la β 4GalT7 suggèrent que l'Asp163 est positionné de façon à interagir avec le résidu Gal du substrat donneur et que l'Asp165 participerait à des liaisons de coordination avec le cation Mn²⁺. Les activités GalT *in vitro* présentées sont standardisées en fonction de la quantité de protéine exprimée dans les cellules grâce à l'établissement d'une gamme de protéine GST-myc (Figures 4A, 4B et 4C, publication n°3). Les valeurs de K_m mesurées indiquent que le mutant D165E présente une affinité vis-à-vis de l'UDP-Gal et de la 4-MOX diminuée d'un facteur d'environ 4 (Tableau 2, publication n°3). Ces résultats indiquent que le Glu serait capable de jouer le rôle de l'Asp en position 165 quoiqu'avec une plus faible affinité comparée à l'enzyme sauvage. Enfin, la mutation de la valine (Val) en position 164 en Ala, ne semble affecter ni l'activité GalT *in vitro*, ni les K_m apparents du mutant vis-à-vis des deux substrats (Figure 4B, Tableau 2, publication n°3). Ces résultats sont en accord avec la structure prédite du site actif où le résidu Val n'interagirait pas directement ou indirectement avec l'UDP-Gal (Figure 3, publication n°3).

Par la même approche, la deuxième série de mutants a permis d'étudier le rôle des résidus compris dans la séquence ²²¹F(Y)WGWGREDD²³⁰ commune aux β4GalTs. La mutation du résidu phénylalanine Phe221 en Ala provoque une diminution d'un facteur 1.5 de l'activité GalT *in vitro* et une forte baisse (d'un facteur 10) de la valeur de K_m de ce mutant vis-à-vis de la 4-MOX (Figure 4C, Tableau 2, publication n°3). Ces résultats suggèrent que l'introduction de cette mutation affecterait la liaison et/ou l'organisation du site de fixation du substrat accepteur, indépendamment du substrat donneur. La mutation de la Phe221 en tyrosine (Tyr) n'induit pas de variations de l'activité GalT *in vitro* ni des valeurs de K_m (Figure 4C, Tableau 2, publication n°3). Par contre, la substitution du Trp222 en Ala diminue de façon drastique l'activité GalT *in vitro* alors que la mutation conservative en Phe n'induit pas de changements notables de l'activité GalT et des valeurs de K_m (Figure 4C, Table 2, publication n°3). Les résultats obtenus avec les mutants G223A et G225A montrent respectivement une forte diminution (34% de l'activité GalT de l'enzyme sauvage) et une abolition totale de l'activité GalT *in vitro* (Figure 4C, publication n°3).

Le modèle structural de la β4GalT7 souligne l'importance fonctionnelle du résidu Trp224 car il interagirait avec le groupement β-phosphate du substrat donneur. La perte d'activité enzymatique après le remplacement du Trp en Ala indique que le noyau aromatique de ce résidu joue effectivement un rôle fonctionnel essentiel. Les mutations du Trp224 en Phe et histidine (His) ont permis de restaurer respectivement l'activité enzymatique d'environ 4% et 12% par rapport à l'enzyme sauvage (Figure 4C, publication n°3). La détermination des constantes cinétiques apparentes du mutant W224H a révélé un K_m vis-à-vis de l'UDP-Gal très augmenté alors que l'affinité pour la 4-MOX serait fortement diminuée (Tableau 2, publication n°3).

Enfin, nous avons réalisé des mutations de la dernière portion ²²⁷EDDE²³⁰ de la séquence ²²¹FWGWGREDD²³⁰, composée exclusivement de résidus à caractère acide. Les mutations de Glu227 en Ala et Asp causent respectivement une perte totale et une baisse de l'ordre de 50% de l'activité GalT sans variation significative des valeurs de K_m pour les substrats donneur et accepteur (Figure 4C, Tableau 2, publication n°3). De façon comparable, la mutation de l'Asp228 en Ala abolit l'activité enzymatique *in vitro* du mutant alors que le mutant D228E conserve 40% de son activité (Figure 4C, publication n°3). Le K_m du mutant D228E vis-à-vis de l'UDP-Gal semble inchangé et celui vis-à-vis de la 4-MOX augmenté d'un facteur 8 suggérant que l'encombrement stérique occasionné par l'allongement de la chaîne latérale contribuerait à la baisse d'affinité de ce mutant vis-à-vis de la 4-MOX (Tableau 2, publication n°3). Enfin les mutations conservative et non conservative du résidu

Asp229 conduisent à une perte totale de l'activité enzymatique de la β 4GalT7 alors que la mutation du Glu en Ala en position 230 n'a que peu d'effets sur les propriétés catalytiques de l'enzyme (Figure 4C, publication n°3).

III.3 Caractérisation *ex vivo* des propriétés fonctionnelles de l'enzyme sauvage et des mutants

Dans le but de déterminer l'importance fonctionnelle des résidus appartenant aux motifs conservés de la β 4GalT7, nous avons entrepris une étude comparative *ex vivo* de l'enzyme sauvage et des 24 mutants exprimés dans les cellules CHO pgsB-618 déficientes en β 4GalT7 (Esko et al., 1987) afin de comparer les premières observations obtenues au cours des études *in vitro*. Pour ce faire, nous avons mis au point une méthode d'extraction des GAGs à partir des milieux de culture par précipitation spécifique au CPC après incorporation de ^{35}S , afin de comparer la capacité de la β 4GalT7 et des mutants à restaurer la synthèse des PGs dans la lignée CHO pgsB-618 déficiente en β 4GalT7 (Esko et al., 1987).

Nous avons quantifié dans un premier temps, pour l'ensemble des mutants, le taux de biosynthèse total des PGs et l'avons comparé aux activités GalT évaluées *in vitro*.

La transfection des cellules pgsB-618 avec le vecteur codant l'enzyme sauvage a permis de corriger la déficience en β 4GalT7 et d'augmenter la synthèse des GAGs d'un facteur 5 par rapport aux cellules transfectées par le plasmide vide (Figure 6, publication n°3). L'étude *ex vivo* des conséquences des mutations du motif $\text{D}^{163}\text{VD}^{165}$ montre que les mutations non conservatives des Asp en Ala ne restaurent que faiblement la production de GAGs (diminuée d'un facteur 2 par rapport à l'enzyme sauvage). Les résultats *in vivo* et *in vitro* pour le mutant D165E concordent car le taux de biosynthèse de GAGs correspondant à 2/3 de celui de l'enzyme sauvage, suggérant que le résidu Glu est capable de remplacer dans une certaine mesure celui de l'Asp. De plus, le résidu Val164 dont l'activité GalT *in vitro* ne subit aucun changement de son activité *in vitro* et *ex vivo* comparativement à l'enzyme sauvage.

L'ensemble de ces résultats *ex vivo* viennent corroborer les résultats obtenus *in vitro* et démontre l'importance fonctionnelle des deux résidus Asp appartenant au motif $\text{D}^{163}\text{VD}^{165}$ et suggèrent que bien que le Glu en position 165 soit capable de lier le cation Mn^{2+} , l'allongement de la chaîne latérale de ce résidu (par rapport à celle de l'Asp dans l'enzyme sauvage) ne constitue pas un facteur favorable à l'interaction avec le Gal du substrat donneur.

Dans la suite de nos travaux, nous avons exploré les conséquences *ex vivo* des mutations au niveau de la séquence $^{221}\text{FWGWGREDDE}^{230}$ sur le taux de biosynthèse des GAGs dans les cellules déficientes en β 4GalT7. Les études *ex vivo* menées sur le premier résidu de cette séquence montrent une augmentation d'un facteur 2 de l'activité du mutant F221A à la fois

dans les études *in vitro* et *ex vivo* (Figures 4C et 6, publication n°3). La mutation conservative F221Y est capable de restaurer la synthèse de GAGs à des taux comparables à l'enzyme sauvage. Ensuite, les mutations conservative et non conservative du résidu W222 en Ala ou Phe conduisent à des effets similaires et se traduisent par une baisse des activités *in vitro* et *ex vivo*. Bien que le mutant W222F possède une activité *in vitro* proche de l'enzyme sauvage, il est incapable de restaurer la biosynthèse des GAGs *ex vivo* à des taux comparables à l'enzyme sauvage. Des expériences complémentaires seront menées afin d'expliquer ce résultat. L'analyse de l'effet des mutations des Gly en position 223 et 225 en Ala, indique que le mutant G225A qui ne présente pas d'activité GalT *in vitro*, est incapable d'assurer la biosynthèse des GAGs dans les cellules déficientes. Par contre, le mutant G223A qui était inactif *in vitro*, peut rétablir la synthèse de GAGs dans les cellules CHO pgsB-618. Ces résultats surprenants nous ont conduits à mener des études plus approfondies sur leurs propriétés cinétiques et à évaluer l'effet de cette mutation sur la synthèse de décorine substituée par une chaîne de GAG et sur le taux de biosynthèse de GAGs totaux après ajout du xyloside 4-MOX dans le milieu de culture de cellules CHO pgsB-618 déficientes en β 4GalT7.

Nous avons également au cours de notre travail, approfondi l'étude des propriétés fonctionnelles des mutants du Trp en position 224 car il semble que ce résidu soit localisé à une position stratégique dans le site actif de l'enzyme. De façon concordante aux résultats obtenus *in vitro*, les mutants W224A et W224F sont dans l'incapacité de restaurer la synthèse de GAGs dans les cellules CHO pgsB-618 (Figure 6, publication n°3). Le mutant W224H qui possède une activité GalT fortement réduite *in vitro*, possède également une faible activité de biosynthèse des GAGs *ex vivo*. L'ensemble de ces résultats appuie un rôle fonctionnel clé du résidu Trp224.

L'étude des résidus acides de la région C-terminale de la séquence ²²¹FWGWGREDDE²³⁰ indique que la mutation du Glu227 en Ala réduit à la fois les activités *in vitro* et *ex vivo* (Figures 4C et 6, publication n°3). La mutation de résidu Asp228 en Ala réduit l'activité *ex vivo* de 50% par rapport à la forme sauvage alors que le mutant D228E est capable de restaurer une biosynthèse de GAGs à des taux proches de ceux mesurés pour l'enzyme sauvage. D'un autre côté, l'analyse des conséquences *ex vivo* des mutations conservative et non conservative du résidu Asp229 a conduit à des résultats inattendus. En effet, bien que les mutants D229A et D229E ne possèdent aucune activité GalT *in vitro*, ils seraient capables d'induire la biosynthèse des GAGs de manière similaire à la β 4GalT7 non mutée. Dans ce dernier cas, nous avons également pour ces deux mutants, entrepris des études ultérieures afin

d'évaluer leur capacité d'initiation de l'amorce à partir de la protéine « core » de la décorine et de la 4-MOX. Enfin, les mutations du résidu Asp230 n'ont que peu d'effets à la fois *in vitro* et *ex vivo*.

III.4 Effets *ex vivo* de l'introduction de mutants β 4GalT7 dans l'initiation de la biosynthèse des GAGs à partir de la protéine « core » de la décorine ou de xyloside exogène

Etant donné que la β 4GalT7 participe de façon précoce à la synthèse de l'amorce tétrasaccharidique, nous avons cherché à savoir si l'introduction d'une enzyme mutée pouvait avoir des répercussions sur les capacités d'initiation de la biosynthèse des GAGs. Pour ce faire, nous avons testé deux amorces en utilisant d'une part une lignée de CHO pgsB-618 modifiée et exprimant de façon stable la « protein core » de la décorine, et d'autre part un substrat exogène xylosidique, la 4-MOX.

La décorine est un PG appartenant à la famille de SRLPs et possède une chaîne unique de CS/DS. De plus, la déficience génétique en β 4GalT7 au cours du syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos est responsable d'une glycosylation défectueuse des petits PGs tels que la décorine. Dans notre étude, la décorine recombinante possède une étiquette His permettant une purification rapide à partir des milieux de culture par chélation sur billes de nickel. Un radiomarquage au ^{35}S est réalisé afin de suivre le taux de biosynthèse de PGs dans les cellules étudiées car les chaînes sulfatées et radiomarquées vont impressionner le film photosensible. Les analyses en SDS-PAGE ont permis de confirmer que la décorine produite par les cellules CHO pgsB-618 ne possédait pas de chaînes de GAG, du fait de l'absence de signal au niveau des gels après radiomarquage au ^{35}S (Figure 7A, publication n°3). Par contre, la transfection de ces cellules par un plasmide codant la β 4GalT7 permet de restaurer une glycosylation sur la protéine « core » de la décorine, visualisable sur les gels SDS-PAGE sous la forme d'une large bande de 66 kDa à 97 kDa correspondant à de la décorine substituée.

La 4-MOX est un substrat de nature xylosidique. Elle possède une partie aglycone qui permet le passage à travers la membrane plasmique des cellules et permet sa prise en charge par la β 4GalT7 pour former un xyloside pourvu de chaînes de GAG appelée Xyl-GAGs. Les Xyl-GAGs sont également visualisables sur un gel SDS-PAGE mais auront un profil de migration différent des PGs possédant une protéine « core ». En effet, du fait d'une masse moléculaire inférieure, les Xyl-GAGs migrent au niveau de la partie inférieure du gel (de 14.3 kDa à 30 kDa) (Figure 7, publication n°3).

Au cours de nos travaux, l'analyse par gel des PGs synthétisés par les mutants G223A et G225A indiquent que la décorine se trouve sous forme glycosylée, avec des taux de

sulfatation comparable à l'enzyme sauvage (Figure 7A, publication n°3). Ces résultats corroborent ceux obtenus *ex vivo* et montrent que ces deux mutants sont capables de produire des GAGs dans les cellules CHO pgsB-618. Nous avons ensuite analysé les conséquences des mutations du résidu Trp224 sur la glycosylation de la décorine. Il apparaît que le mutant W224A est incapable de produire une décorine glycosylée alors que le mutant W224F produit de la décorine à la fois glycosylée et sulfatée dans les cellules CHO pgsB-618 déficientes en β 4GalT7. Enfin, l'analyse de l'effet des mutations D229A et D229E sur la décorine montrent que ces mutants sont capables de restaurer la glycosylation de la protéine « core » de la décorine. Ce résultat est en accord avec la restauration de la biosynthèse des GAGs totaux observés *ex vivo*.

Enfin, dans une approche complémentaire, nous avons déterminé si les mutants G223A, G225A, D229A et D229E étaient capables d'initier la biosynthèse des GAGs à partir d'une amorce xylosidique dans les cellules déficientes en β 4GalT7. Dans un premier temps, l'analyse en SDS-PAGE a permis de confirmer que les cellules CHO pgsB-618 transfectées par le plasmide vide sont incapables d'initier la biosynthèse de Xyl-GAGs (Figure 7B, publication n°3). Dans un second temps, l'analyse du gel de Xyl-GAGs pour l'enzyme sauvage confirme qu'elle est capable de prendre en charge le substrat 4-MOX, de la même façon que le mutant G223A. Ce résultat est en accord avec l'activité GalT *in vitro* relevée pour ce mutant. Toutefois, le mutant G225A qui ne présentait pas d'activité *in vitro*, ne peut également pas restaurer la biosynthèse des Xyl-GAGs dans les cellules CHO pgsB-618. De façon contraire, ce dernier est capable de synthétiser une décorine sous forme glycosylée, ce qui suggère que la 4-MOX ne peut être prise en charge dans le cas de ce mutant. Nous avons obtenu des résultats *in vitro* et *ex vivo* comparables pour le mutant Asp229 (Figure 7B, publication n°3). Des études seront nécessaires afin de déterminer pour quelles raisons les mutants G225A et D229A ne peuvent prendre en charge la 4-MOX comme substrat accepteur.

Discussion

Les PGs à HS sont positionnés de façon stratégique à la surface des cellules et au sein des MEC. Leur capacité d'interaction avec de multiples protéines, facteurs de croissance, récepteurs et protéines de la MEC est principalement liée à la présence de charges négatives situées au niveau de leurs chaînes de GAG (Lindahl, 2007). La structure et la composition de ces chaînes gouvernent la spécificité d'interaction avec ces médiateurs solubles et constituent par conséquent des éléments critiques de leur fonction. Du fait de leur caractère hétérogène, on peut supposer qu'un contrôle strict au niveau de leurs voies de biosynthèse est nécessaire pour permettre une action coordonnée de l'ensemble des enzymes de synthèse et de modification. Dès lors, on comprend qu'une défaillance au niveau de la machinerie enzymatique peut compromettre ces interactions et avoir de profondes conséquences sur le comportement cellulaire. Au cours du processus de cancérisation, Sanderson et al. (2001) ont rapporté une modification de la qualité et une diminution de la quantité des PGs à HS présents à la surface des cellules cancéreuses (Sanderson, 2001). De plus, des travaux indiquent qu'un défaut de sulfatation des chaînes de HS modifie les propriétés d'adhésion des cellules tumorales aux composants de la MEC (fibronectine, laminine, collagène) favorisant ainsi leur dissémination (Robinson et al., 1984 ; Stamatoglou et Keller, 1983).

Dans ce contexte, l'élucidation des mécanismes de régulation des voies biosynthétiques représente un enjeu médical considérable car l'implication des PGs dans la pathogénie de diverses affections (cancer, maladie d'Alzheimer, arthropathies...) est évoquée de façon récurrente dans de nombreuses publications.

Nous avons focalisé une partie de notre étude sur la caractérisation moléculaire d'une enzyme impliquée dans les premières étapes des voies de biosynthèse des GAGs, la β 4GalT7 (Gulberti et al., 2005). Cette enzyme catalyse l'addition du second résidu glucidique, le Gal sur un résidu Xyl lié de façon covalente à une protéine porteuse (Almeida et al., 1999). Il a été démontré qu'il est possible *in vitro* et *in vivo* de « mimer » cette amorce glycopeptidique en utilisant un motif Xyl couplé à une aglycone de nature hydrophobe. Ce type d'analogue qui peut pénétrer dans la cellule grâce à son caractère hydrophobe, est capable d'initier la biosynthèse des GAGs à des niveaux supérieurs à ceux observés avec l'amorce glycopeptidique naturelle. Cette enzyme représente ainsi une cible pharmacologique potentielle car l'utilisation de dérivés xylosidiques constituerait une nouvelle approche

thérapeutique intéressante dans le but de contrecarrer ou de pallier à une biosynthèse anormale liée à une perturbation du métabolisme des PGs (Mani et al., 1998 ; Martin et al., 1996).

Dans le cadre de ce travail, nous avons réalisé un alignement multiple de 33 séquences extraites à partir de l'arbre phylogénétique des gènes codant les β 4GalT1-6 humaines et les β 4GalT7 identifiées au sein du génome de différentes espèces et mis en évidence la présence de deux séquences fortement conservées, un motif « signature » DXD et la séquence WGXEDD/V/W (Qasba et al., 2008). Les analyses phylogénétiques ont été complétées par l'établissement d'une modélisation de la structure 3D de la β 4GalT7 à partir de la β 4GalT1 bovine qui représente la seule isoforme des β 4GalTs disponible sous forme cristallisée (Ramakrishnan et al., 2002). Dans un second temps, sur la base des connaissances apportées par les données phylogénétiques et le modèle structural, nous avons tenté de déterminer par une technique de mutagenèse dirigée le rôle des acides aminés essentiels la reconnaissance des substrats donneur et accepteur et/ou à la catalyse enzymatique de la β 4GalT7. Nous avons également développé des approches complémentaires afin d'explorer les conséquences fonctionnelles des mutations de la β 4GalT7 sur la biosynthèse des GAGs *ex vivo*. Nous avons comparé la capacité de l'enzyme sauvage et des mutants à restaurer la biosynthèse des GAGs dans les cellules CHO pgsB-618 déficientes en β 4GalT7 (Esko et al., 1987). La β 4GalT7 étant impliquée de façon précoce dans les voies de biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique, nous avons également évalué la capacité des mutants à initier la synthèse de GAGs en testant deux substrats de nature différente. Le premier consiste en la protéine « core » de la décorine recombinante, substrat proche de l'amorce glycopeptidique naturelle des GAGs alors que le deuxième possède une fraction aglycone couplée à un résidu Xyl, la 4-MOX.

La première série de tests *in vitro* a consisté en la réalisation de mutations conservative et non conservative au niveau des résidus Asp163 et Asp165 du motif DVD et la totalité des résidus qui composent la séquence consensus ²²¹FWGWGREDD²³⁰ de la β 4GalT7. L'ensemble des études *ex vivo* corroborent les résultats *in vitro* suggérant l'importance fonctionnelle des deux résidus Asp du motif D¹⁶³VD¹⁶⁵. La β 4GalT7 présente un repliement caractéristique des GTs de type GT-A où le cofacteur métallique, le Mn²⁺, établit une liaison de coordination avec au moins l'un des acides aspartiques du motif DVD (Bourne et Henrissat, 2001). Le modèle moléculaire et les résultats expérimentaux obtenus après remplacement du résidu Asp165 en Glu indiquent que ce dernier jouerait un rôle dans la coordination du Mn²⁺ et que sa substitution en Glu permet de conserver une partie de l'activité catalytique de l'enzyme. Au contraire, l'allongement de la chaîne latérale par la mutation en Glu en position 163 est

défavorable aux interactions de l'enzyme avec le Gal du substrat donneur. Enfin, l'analyse des conséquences de la mutation de la Val164 en Ala indique que ce résidu ne semble pas jouer de rôle important dans la fixation de l'UDP-Gal. L'ensemble des résultats montre que la structure du motif D¹⁶³VD¹⁶⁵ de la β 4GalT7 est très similaire aux GTs de type GT-A dans laquelle le premier résidu acide interagit avec le sucre du substrat donneur alors que le second assure des liaisons de coordination avec le cation Mn²⁺ (Breton et al., 2006).

La deuxième série d'investigations a porté sur la séquence conservée ²²¹FWGWGREDDE²³⁰ qui comprend deux parties, l'une N-terminale composée de cinq résidus à caractère hydrophobe et l'autre C-terminale contenant des résidus à caractère acide. Les mutations conservative et non conservative des résidus Phe221 et Trp222 induisent des modifications modérées des activités *in vitro* et *ex vivo* et n'affectent pas les valeurs de K_m vis-à-vis de l'UDP-Gal, suggérant que ces résidus ne seraient pas directement impliqués dans la liaison du substrat donneur. Ces résultats s'expliqueraient par une localisation de la chaîne latérale à l'extérieur du site de fixation de l'UDP-Gal, comme le suggère le modèle structural de la β 4GalT7. Cependant, du fait de leur caractère conservé, on peut supposer qu'ils soient néanmoins importants au niveau de la structure de l'enzyme.

Nous avons ensuite analysé les conséquences *in vitro* et *ex vivo* des mutations conservative et non conservative du Trp224 dont la situation centrale au niveau de site actif suggère une importance fonctionnelle. La substitution de ce résidu par une Ala conduit à une forme inactive de l'enzyme *in vitro* en accord avec cette hypothèse. De façon concordante, ce mutant est incapable d'assurer à la fois la glycosylation de la protéine « core » de la décorine et l'initiation de la biosynthèse de GAGs dans des cellules CHO déficientes en β 4GalT7. Le remplacement du large noyau indole du Trp par le noyau phényle de la Phe permet de restaurer de façon partielle les activités *in vitro* et *ex vivo*. Cependant, les activités faibles ne permettent pas une étude cinétique. De façon intéressante, la mutation du Trp224 en His produit un mutant possédant une affinité multipliée d'un facteur 5 vis-à-vis de l'UDP-Gal comparativement à l'enzyme sauvage alors que l'affinité de ce même mutant vis-à-vis de la 4-MOX se retrouve fortement diminuée. Ces résultats ont été confirmés par la mesure des paramètres cinétiques de ce mutant sous forme purifiée à partir de culture de bactéries *E.coli* recombinantes. Les études menées à partir du modèle structural de la β 4GalT7, suggèrent que l'azote NE1 du Trp224 interagirait *via* une liaison hydrogène, avec le groupement β -phosphate du pyrophosphate de l'UDP-Gal. Dans la structure cristallographiée de la β 4GalT1 bovine, il a été proposé en outre que le Trp314 (équivalent au Trp224 de la β 4GalT7) aiderait à la fixation du substrat accepteur par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes (Ramasamy et

al., 2003). Sachant que la liaison du substrat donneur est nécessaire à celle du substrat accepteur, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle l'azote NE2 du noyau imidazole de l'His maintient une liaison hydrogène avec le pyrophosphate de l'UDP-Gal. Ainsi, on peut supposer que la présence d'un seul cycle aromatique (imidazole) comparativement au noyau indole du Trp diminuerait les interactions avec la 4-MUX et pourrait être partiellement remplacée par le noyau aromatique de l'His. De façon concordante, le rôle clé du résidu Trp au niveau du centre catalytique de l'enzyme a été rapporté pour de nombreuses GTs. Le Trp314 de la β 4GalT1 (Ramakrishnan et Qasba, 2001), le Trp284 de l'EXTL2 (Pedersen et al., 2003), ou le résidu Trp314 de l' α -3GT (Zhang et al., 2003) sont localisés de manière à permettre l'interaction du Trp à la fois avec le résidu Gal du substrat donneur et le substrat accepteur. Ces résultats mettent en évidence la présence d'un résidu Trp comme un élément important dans la structure des GTs.

Dans la structure de la β 4GalT1 bovine, le Trp314 qui est localisé à une position équivalente au Trp224 de la β 4GalT7, est entouré de résidus Gly qui permettraient un mouvement rotationnel du Trp durant le changement conformationnel lors de la fixation de l'UDP-Gal (Ramakrishnan et al., 2002). Nous avons par conséquent, analysé le rôle de ces deux résidus Gly. La mutation en Ala de la Gly223 produit une baisse modérée des activités *in vitro* et *ex vivo*. L'analyse des conséquences du mutant G225 nous a conduits à des observations intéressantes. En effet, nos résultats suggèrent que la mutation de ce résidu en Ala abolit l'activité *in vitro* de l'enzyme et ne permet pas de restaurer une biosynthèse de Xyl-GAGs à partir de la 4-MOX dans les cellules CHO pgsB-618 déficientes. De façon contraire, ce mutant est capable de corriger la déficience des cellules pgsB-618 et de rétablir la biosynthèse de GAGs à des taux comparables à l'enzyme sauvage en catalysant efficacement l'initiation de la biosynthèse de la chaîne de GAG à partir de la protéine « core » de la décorine qui est exprimée de façon stable dans une lignée CHO pgsB-618 génétiquement modifiée. Ce résultat suggère que la présence du groupement méthyle du résidu Ala en position 225 empêche la liaison du groupement hydrophobe de la 4-MOX.

Enfin, nous avons exploré l'importance fonctionnelle des résidus à caractère acide situés en position C-terminale de la séquence ²²¹FWGWGREDDE²³⁰, région fortement conservée au sein des membres de la famille des gènes codant les β 4GalTs. L'analyse des conséquences *in vitro* de la mutation non conservative de Glu227 en Ala abolit complètement l'activité enzymatique alors que la substitution en Asp rétablit de façon partielle l'activité GalT. La détermination des paramètres cinétiques du mutant E227D exprimé dans un système eucaryote et en bactéries, ne met pas en évidence de changement de l'affinité de ce mutant

vis-à-vis de l'UDP-Gal. L'ensemble de ces données suggèrent le rôle possible de ce résidu comme base catalytique de l'enzyme en aidant à la déprotonation du substrat accepteur et à l'attaque nucléophile sur le carbone C1 du Gal de l'UDP-Gal. Cette hypothèse est en accord avec la structure 3D de la β 4GalT1 bovine complexée avec l'UDP-Gal, proposée par Gastinel et al. (1999) et où le Glu317 (équivalent du Glu227) jouerait le rôle de base catalytique. Les expériences *ex vivo* corroborent les résultats précédents. D'un autre côté, l'analyse structurale de la β 4GalT1 bovine réalisée par Ramasamy et al. (2003) suggère que ce serait plutôt le résidu Asp318 (équivalent au D228 de la β 4GalT7) qui serait impliqué dans le mécanisme catalytique. Cependant, sachant que les mutants D228E et D228A gardent une partie de leur activité GalT, on peut penser que le Glu227 est potentiellement un meilleur candidat pour jouer le rôle de base catalytique de la β 4GalT7. Des études supplémentaires sont en cours afin de confirmer ces premières constatations.

Ce travail qui permet de mieux cerner les éléments structuraux régissant l'organisation du site actif de la β 4GalT7 et son mécanisme catalytique, apporte des informations importantes à l'appui de notre démarche. Notre étude fournit des bases plus rationnelles en vue de stratégies de biosynthèse de GAGs à partir d'amorces de nature exogène, capables de pallier à une déficience des constituants matriciels du cartilage au cours du processus arthrosique par exemple, ou de dérivés xylosidiques pour le développement d'agents anti-thrombotiques (Martin et al., 1996), anti-tumoraux (Mani et al., 1998), et anti-arthrosique (Venkatesan et al., 2004). Des études physicochimiques sont en cours afin de mieux cerner les mécanismes de fixation du substrat accepteur.

Des travaux précédents réalisés dans notre équipe avaient souligné l'influence de la sulfatation sur la régulation de l'assemblage des chaînes de GAGs (Gulberti et al., 2005). Dans ce contexte, nous avons exploré dans la deuxième partie de cette thèse, les mécanismes responsables de la modulation de l'expression des enzymes participant aux voies de biosynthèse de PGs au cours des arthropathies. En effet, de récents travaux ont suggéré l'implication d'un mécanisme de régulation épigénétique dans la pathogénie de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde (Roach et al., 2005 ; Strietholt et al., 2008). De même la 3-OST2, qui participe à la sulfation des chaînes de HS, présente également une hyperméthylation de sa région promotrice proximale et du premier exon dans de nombreux échantillons de tumeurs et lignées cellulaires tumorales (sein, colon, poumons, pancréas) (Miyamoto et al., 2003).

Dans le but de déterminer si un mécanisme épigénétique est à l'origine de la régulation des voies de biosynthèse des PGs, nous avons réalisé dans un premier temps une étude détaillée de la séquence de la région promotrice proximale et du premier exon des gènes codant les

GTs et STs impliquées respectivement dans les voies de biosynthèse et de modification des chaînes de HS. Ainsi, l'analyse des profils de méthylation des gènes codant les GTs responsable de l'initiation des chaînes de PGs a révélé la présence de régions riches en dinucléotides CpG appelées îlots CpG. Toutefois, nous n'avons relevé pour ces gènes qu'un faible nombre de sites CpG méthylés dans les cellules HEMC écartant la possibilité d'une régulation de ces gènes *via* la méthylation de l'ADN. Sachant que les quatre GTs qui participent à la synthèse de l'amorce tétrasaccharidique sont communes aux chaînes de HS et CS, on peut penser qu'un déficit en l'une de ces GTs aurait des conséquences fortement délétères pour la cellule en abolissant la biosynthèse des deux types de GAGs.

Compte tenu du rôle majeur des HS dans le processus de carcinogenèse, nous avons ensuite examiné le profil de méthylation du gène codant l'EXT1 qui est une enzyme clé dans la polymérisation des chaînes de HS. Le faible nombre de sites CpG méthylés et l'absence d'augmentation d'expression des transcrits EXT1 dans les cellules traitées par un agent inhibiteur de la méthylation de l'ADN nous ont permis d'éliminer la possibilité d'une régulation épigénétique pour ce gène. De plus, des analyses biochimiques des chaînes de HS cellulaires par chromatographie d'exclusion stérique ont confirmé que le traitement 5-Aza-dc n'affecte pas la longueur des chaînes de HS dans les cellules traitées et non traitées. Enfin, l'absence de méthylation de la région promotrice du gène *EXT1* dans les cellules HEMC est corroborée par les résultats obtenus dans des tumeurs de chondrosarcomes ou d'ostéosarcomes (Hameetman et al., 2007). De façon intéressante, Ropero et al. (2004) ont mis en évidence la présence d'une hyperméthylation du promoteur du gène *EXT1* dans la lignée cellulaire HL-60 (cellules de leucémie promyélocytaire) suggérant que l'expression de cette enzyme est réprimée par un mécanisme épigénétique, et laisse supposer un rôle critique de cette enzyme dans le développement de ce type de cancers (Ropero et al., 2004). Dans notre étude et celle réalisées par d'autres, il semble que le gène codant l'EXT1 ne soit pas régulé par un mécanisme épigénétique *via* la méthylation de l'ADN et ne serait également pas impliqué dans la pathogénie de ce type de chondrosarcome (Ropero et al., 2004).

Dans la suite de nos travaux, nous avons réalisé à une analyse approfondie des STs impliquées dans la sulfatation des HS, modification essentielle aux propriétés structurales et fonctionnelles des HS, afin de mettre en évidence l'implication potentielle d'un mécanisme de régulation épigénétique sur leur taux d'expression. De façon intéressante, l'inspection des profils de méthylation des deux familles de gènes codant les NDSTs et les *O*-sulfotransférases a révélé la présence d'une hyperméthylation au niveau de la région promotrice proximale et du premier exon pour les gènes *3-OST1*, *-3A* et *-6* et une méthylation modérée du gène codant

l'isoforme 3-OST2 dans les cellules HEMC. Par contre, un faible taux ou une absence de méthylation a été relevé pour les gènes *NDST2*, *NDST3*, *HS2ST1* et *HS6ST1* dans les cellules HEMC.

Dans un deuxième temps, l'implication d'une méthylation de l'ADN comme élément régulateur de la *O*-sulfatation des PGs à HS a été confirmée par l'utilisation d'un agent inhibiteur des DNMTs, la 5-Aza-dc. Ce traitement a permis d'augmenter de façon importante l'expression des transcrits codant la 3-OST3A et moins fortement celle des 3-OST1, 3-OST2 dans les cellules traitées. De plus, l'analyse du taux de méthylation du gène *3-OST3A* au niveau de la région promotrice proximale et du premier exon après traitement à la 5-Aza-dc a mis en évidence une baisse du taux de méthylation de ce gène, consécutive au traitement. Ce résultat indique que l'augmentation de l'expression du gène *3-OST3A* est le résultat du moins en partie, d'une déméthylation de la région promotrice de ce gène.

Les cartes de méthylation des gènes *3-OST3B*, *HS2ST1* et *HS6ST1* ne montrent que très peu de sites CpG méthylés au niveau de leur région promotrice proximale et du premier exon. De façon concordante, le taux d'expression des transcrits correspondant est inchangé dans les cellules après traitement. Par contre, la présence d'une hyperméthylation des gènes *NDST1* et *HS6ST2* au niveau de leur région promotrice proximale et du premier exon combinée à une augmentation de leur niveau d'expression après traitement avec la 5-Aza-dc mettent en cause une régulation *via* la méthylation de l'ADN. Nous avons comme dans le cas du gène *3-OST3A*, quantifié le taux de méthylation des gènes *NDST1* et *HS6ST2* dans des cellules traitées et confirmé que l'induction d'expression de ces deux gènes est due au moins en partie, à la déméthylation de leur région promotrice. Toutefois, nous avons observé également de forts taux de méthylation de ces deux gènes dans des cellules sanguines utilisées comme contrôle.

Sur la base de ces observations, il nous est apparu important d'étudier les conséquences fonctionnelles de la dérégulation *via* un mécanisme d'hyperméthylation, des gènes *3-OST1* et *-3A*, spécifiques des cellules HEMC. Pour ce faire, nous avons en premier lieu évalué les conséquences d'une induction d'expression des gènes hyperméthylés appartenant à la famille des STs à HS sur la composition et la fonction des chaînes de HS. En se basant sur des analyses biochimiques des PGs cellulaires après radiomarquage au ^{35}S , nous en avons conclu que les changements observés concernent principalement la charge des HS. De plus, grâce à la technique de chromatographie d'exclusion stérique et le double radiomarquage des cellules par du $^{35}\text{S}[\text{SO}_4]$ et de la $^3\text{H}[\text{GlcN}]$, nous avons mis en évidence une forte augmentation du taux de sulfatation des chaînes de HS après traitement des cellules sans changement notable de leur taille, par calcul du ratio $^{35}\text{S}/^3\text{H}$. De plus, nous avons pu mettre en évidence une

augmentation significative de la quantité de PGs en réalisant un radiomarquage à la cystéine et méthionine radiomarquées au ³⁵S afin d'évaluer le taux de biosynthèse total des protéines. Enfin, les analyses en immunofluorescence ont confirmé la présence d'un marquage péricellulaire de forte intensité correspondant aux HS cellulaires dans les cellules traitées. Ce marquage a pu être attribué en partie à l'expression des 3-OST1 et -3A comme le démontrent des expériences de surexpression de ces deux enzymes dans les cellules HEMC.

La dernière partie de notre étude a pour but de mesurer à l'échelle cellulaire, les effets de l'augmentation de sulfatation des HS cellulaires sur le comportement des cellules HEMC. Pour ce faire, nous avons réalisé une série de tests cellulaires sur les cellules traitées à la 5-Aza-dc d'une part, et des cellules surexprimant les isoformes 3-OST1 ou -3A, d'autre part.

Les tests de mesure de la prolifération cellulaire ont mis en évidence un ralentissement de la croissance des cellules traitées et transfectées par la 3-OST3A. De plus, les cellules surexprimant l'isoforme 3-OST3A présentent une capacité d'adhésion supérieure aux cellules « contrôles » à la fibronectine liée à une base de polystyrène, soulignant l'importance de cette modification dans le phénomène adhésion cellulaire. Il est clairement établi que les chaînes de HS jouent un rôle prépondérant dans la régulation du comportement des cellules cancéreuses en modulant et coordonnant la motilité, l'adhésion et la croissance cellulaires (Sanderson, 2001). Ce résultat vient corroborer des travaux récents portant sur l'importance de la composition des chaînes de HS dans la fixation de la fibronectine au niveau du domaine HepII (Mahalingam et al., 2007). Nos résultats suggèrent que la 3-O-sulfatation catalysée par la 3-OST3A serait un facteur déterminant dans la liaison de la fibronectine. Des travaux supplémentaires seront nécessaires afin d'évaluer le rôle de cette modification dans d'autres lignées tumorales. Enfin, des tests de migration *in vitro* ont clairement démontré que le traitement à la 5-Aza-dc ainsi que la surexpression de la 3-OST1 ou -3A réduisaient de façon significative la motilité des cellules HEMC.

Actuellement, la modification du résidu GlcNS en position 3 est considérée comme un phénomène rare, catalysé par sept isoformes distinctes de la famille de 3-OSTs. La 3-OST1 assure la sulfatation en position 3 d'une GlcNS reliée à un GlcA, au niveau de son extrémité non réductrice pour fournir le motif de liaison requis pour la liaison de l'antithrombine. Les chaînes de HS modifiées par les 3-OST2, -3A, -3B, -4 et -6 se lient à la glycoprotéine gD du HSV-1 pour pénétrer au sein de la cellule-hôte (Shukla et al., 1999 ; Xu et al., 2005). Bien que les fonctions de cette modification soient encore mal connues, on lui attribue également un rôle dans la filtration glomérulaire et la fixation du facteur de croissance FGF-7 (ou *Keratinocyte Growth Factor*, KGF) (Ye et al., 2001). Des schémas spécifiques de sulfatation

sont nécessaires à la fixation des FGFs pour l'induction des voies de signalisation médiées par ces derniers. Des études *in vivo* menées sur des souris transgéniques indiquent de façon claire que les changements de la structure des chaînes de HS cellulaires ont des effets sur la croissance tumorale et la dissémination des métastases (Yang et al., 2007).

Enfin, nous avons également dans nos travaux, étudié la lignée cellulaire MCF7 provenant d'un adénocarcinome du sein. Le cancer du sein est une tumeur maligne de la glande mammaire. Ce cancer est le plus fréquent chez la femme, et représente la première cause de mortalité parmi les cancers gynécologiques des pays développés. Il est reconnu que les PGs à HS ont un impact direct sur le phénotype des cellules de la glande mammaire en modulant la vitesse de croissance, et le potentiel migratoire et invasif (Mundhenke C et al., 2002 ; Sanderson et al., 2004). L'altération de la structure et de l'expression des PGs à HS constituent des facteurs critiques dans le développement de tumeur du sein car ils jouent de rôle comme co-récepteurs de nombreux médiateurs solubles tels que le FGF-2, le VEGF (Sasisekharan et al., 2002). Par exemple, il est décrit que le domaine transmembranaire du syndécan-1 aurait un effet sur la prolifération des cellules MCF7 *via* les chaînes de HS (Su et al., 2007). De plus, une diminution d'expression de la protéine « core » de la décorine et des changements des chaînes de GAG seraient également impliqués dans la transformation en tumeur maligne de la glande mammaire (Rykova et al., 2007).

Comme nous l'avons dit précédemment, la méthylation aberrante des îlots CpG joue un rôle important dans le développement et la progression tumorales. Ainsi, des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN tels que le gène *FANCC* (*Fanconi anaemia Complementation-group C*) seraient impliqués par des altérations épigénétiques dans la pathogénie du cancer du sein (Sinha et al., 2008). Au cours de nos travaux, nous avons identifié les gènes de la famille des 3-OSTs comme étant hyperméthylés au niveau de leur région promotrice proximale et du premier exon dans les lignées cellulaires étudiées. De façon intéressante, l'analyse des cartes de méthylation de ces gènes montre des différences de profil entre les membres de cette famille. Nos résultats montrent que les gènes *3-OST2* et *-3A* sont fortement méthylés alors que le gène *3-OST3B* ne l'est pas, dans les cellules MCF7. De plus, nous avons également mis en évidence une faible méthylation du gène *3-OST1* dans ces cellules. Ces résultats suggèrent que la méthylation aberrante de l'ADN gouvernerait l'expression de ces gènes. Nos résultats sont en accord avec une publication précédente démontrant que le gène *3-OST2* est hyperméthylé dans de nombreuses tumeurs du sein (Miyamoto et al., 2003). Ainsi, afin d'évaluer les conséquences des mécanismes d'hyperméthylation des régions promotrices des

gènes codant les 3-OSTs, nous avons traité les cellules MCF7 avec la 5-Aza-dc afin de déterminer si l'expression des transcrits codés par les gènes hyperméthylés était changée. De façon intéressante, nous avons constaté une hausse significative de l'expression des transcrits codés par les gènes *3-OST1* et *-3A* dans les cellules traitées, mettant ainsi en évidence un mécanisme de régulation épigénétique de ces deux gènes *via* un mécanisme de méthylation de l'ADN.

Des travaux réalisés par Ye et al. (2001) indiquent que le FGF-7 reconnaît de façon spécifique la 3-*O*-sulfatation présente sur les chaînes de HS (Ye et al., 2001). Dans ce contexte, nous avons testé si l'influence de la surexpression de la 3-OST1 et -3A sur l'activation de la phosphorylation de la protéine p44/42 ou la protéine p38 dans les cellules MCF7. Pour ce faire, nous avons transfecté les cellules MCF7 avec les vecteurs codant les STs 3-OST1 ou -3A et traité les cellules avec le facteur de croissance FGF-7. Les résultats obtenus suggèrent une augmentation de la quantité de la protéine p44/42 sous la forme phosphorylée suite la liaison du FGF-7 dans les cellules transfectées. Enfin, nous avons également mis en évidence un effet anti-prolifératif important suite à la surexpression des enzymes 3-OST1 ou -3A dans les cellules MCF7. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être confirmés par des expériences complémentaires. Il sera intéressant de poursuivre l'élucidation de l'influence de la 3-*O*-sulfatation sur la régulation du FGF.

Ces travaux mettent en évidence un nouveau rôle de la 3-*O*-sulfatation en tant qu'événement régulateur de la prolifération et de la migration dans les cellules tumorales issues de tissus conjonctifs et épithéliaux, et fournissent des informations clé pour une meilleure compréhension des mécanismes d'invasion et de progression tumorales. Ces données soulignent l'importance des modifications structurales des motifs saccharidiques des chaînes de HS et leur implication dans les pathologies cancéreuses.

Conclusions et perspectives

Nous avons au cours de cette thèse, développé deux axes d'étude complémentaires visant à une meilleure compréhension des mécanismes de biosynthèse des chaînes glycosaminoglycaniques des PGs et de leur mode de régulation.

Notre travail a consisté d'une part en une caractérisation fonctionnelle et structurale de la β 4GalT7, impliquée de façon précoce dans les voies de biosynthèse des GAGs. Cette enzyme catalyse le transfert du premier résidu Gal sur le Xyl relié à la protéine « core », étape nécessaire à la formation de l'amorce tétrasaccharidique et est indispensable à la polymérisation ultérieure des deux principaux types de chaînes de GAGs (Hep/HS et CS/DS). Pour ce faire, nous avons mis au point un système d'expression hétérologue dans des cellules eucaryotes, généré des mutants de la β 4GalT7 par mutagenèse dirigée, déterminé les paramètres cinétiques *in vitro* de l'enzyme sauvage et des mutants et mené des études *ex vivo* afin de mesurer les conséquences fonctionnelles des mutations introduites sur une lignée cellulaire déficiente en β 4GalT7. Ces travaux ont été réalisés avec l'appui d'un modèle moléculaire de la structure 3D de la β 4GalT7, établi à partir de celle de la β 4GalT1 bovine et d'une analyse phylogénétique de 33 séquences codant les gènes des β 4GalTs. Dans un premier temps, l'analyse des propriétés cinétiques d'une série de mutants a permis d'identifier, au sein de deux domaines conservés, les acides aminés potentiellement impliqués dans la reconnaissance du substrats donneur et accepteur. Notre travail a permis de mettre en évidence le rôle des résidus D163 et D165 du motif DXD dans la fixation de l'UDP-Gal *via* la liaison du Mn^{2+} et de façon intéressante, l'importance majeure du Trp224 dans les interactions avec les substrats donneur et accepteur. Nos résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le résidu E227 pourrait potentiellement jouer le rôle de base catalytique lors du mécanisme réactionnel de la β 4GalT7.

Dans un second temps, nous nous sommes particulièrement intéressés aux conséquences fonctionnelles des mutations de la β 4GalT7 sur la biosynthèse des PGs. Nous avons mis en œuvre des modèles d'étude *ex vivo*, dans les cellules eucaryotes recombinantes, des conséquences fonctionnelles des mutations introduites sur le taux de biosynthèse des GAGs. Nous nous sommes également attachés à l'étude de l'initiation de l'amorce tétrasaccharidique à partir d'un PG modèle ou d'un xyloside exogène. L'ensemble des données fournies par les études *in vitro* et *ex vivo* ont permis de mieux cerner le rôle des résidus impliqués dans l'organisation du site de fixation des substrats donneur et accepteur et/ou la catalyse

enzymatique de la β 4GalT7. Ces informations apportent des bases rationnelles en vue du développement de composés chimiques ou de glycomimétiques à visée pharmacologique capables de contribuer à la restauration de la MEC endommagée (lors des atteintes dégénératives du cartilage), ou de manière plus générale, dans le traitement de pathologies liées à une perturbation du métabolisme des PGs. La β 4GalT7 représente en effet une cible thérapeutique de choix par sa capacité de prendre en charge des composés mimant l'amorce glycopeptidique.

Dans le but d'accéder à une meilleure compréhension des bases moléculaires qui régissent les modalités nécessaires à la reconnaissance des substrats donneur et accepteur, nous souhaitons approfondir ces travaux par des études de résonance plasmonique de surface et des analyses structurales par radiocristallographie. Des expériences de purification de la β 4GalT7 fusionnée à la protéine GST dans un système d'expression hétérologue bactérien sont en cours de réalisation dans notre équipe afin de poursuivre les travaux entrepris.

Dans une partie complémentaire de notre travail, nous nous sommes intéressés aux phénomènes responsables de la régulation de l'expression des enzymes participant à la biosynthèse des GAGs en étudiant la possibilité de l'implication de la méthylation de l'ADN comme élément de régulation. Nous avons étudié en premier lieu un modèle de lignée invasive du tissu conjonctif, la lignée de chondrosarcome humain HEMC et réalisé la cartographie de méthylation des régions promotrices des gènes codant les enzymes responsables de la synthèse et des modifications des chaînes de HS. Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois qu'une famille spécifique de HS-*O*-sulfotransférases (les 3-OSTs) présente une hyperméthylation des îlots CpG situés au niveau de la région proximale des gènes conduisant à une diminution d'expression des transcrits correspondants, dans les cellules HEMC.

Les conséquences néfastes des diminutions d'expression des gènes hyperméthylés sur le comportement des cellules cancéreuses HEMC ont pu être corrigées par traitement des cellules avec un inhibiteur des DNMTs, la 5-Aza-dc. L'analyse de l'impact de la surexpression des STs 3-OST1 et 3OST-3A a permis d'attribuer de manière spécifique une contribution de la 3-*O*-sulfatation au phénotype de cette lignée cancéreuse. En effet, nos travaux suggèrent que la baisse de sulfatation des PGs à HS cellulaires (en position 3 des GlcNS) affecte le comportement cellulaire et contribue à l'altération de phénotype cellulaire et des caractéristiques invasives des cellules de chondrosarcome humain HEMC.

Des travaux ont été initiés afin d'établir le rôle de cette modification dans d'autres lignées cancéreuses (chondrosarcome SW 1353, MCF7). Nous souhaitons à court terme mesurer les effets de la répression de ces gènes dans les lignées tumorales et mieux cerner l'impact potentiel de la 3-*O*-sulfatation dans d'autres types de tumeurs. De plus, d'autres mécanismes de régulation épigénétique notamment les modifications touchant les histones, n'ont pas été abordés dans cette étude. Il serait intéressant de voir si le traitement des cellules par un inhibiteur des HDACs, la trichostatine A, potentialiserait les effets cellulaires obtenus par la déméthylation des gènes. Par ailleurs, l'influence de la 3-*O*-sulfatation des HS membranaires sur la régulation des facteurs de croissance est une piste à creuser. Nous souhaiterions également réaliser des analyses plus poussées de la composition disaccharidique des HS par la technique RPIP-HPLC (*Reversed-phase ion-pairing-High Performance Liquid Chromatography*) ou par spectrométrie de masse afin de définir les spécificités de substrat des différentes STs et les effets cellulaires associés aux caractéristiques structurales des motifs disaccharidiques des chaînes de GAGs. Enfin, nous nous sommes focalisés, dans le cadre de cette thèse, aux enzymes de biosynthèse des HS. De plus, l'étude du rôle potentiel de modifications épigénétiques des voies de biosynthèse des CS dans le processus de cancérogenèse est certainement une hypothèse très intéressante à envisager.

Du fait de leur caractère réversible, l'usage d'agents inhibiteurs des DNMTs s'est révélé efficace dans le traitement d'hémopathies malignes et est employé pour traiter les tumeurs solides. Les chondrosarcomes restent des cancers difficiles à diagnostiquer et à traiter car ces tumeurs sont résistantes aux thérapies conventionnelles. Ces résultats ouvrent des perspectives prometteuses dans la découverte et la compréhension de nouveaux mécanismes cellulaires basés sur la reconnaissance de certains motifs portés par les HS présents à la surface des cellules tumorales et qui concourent au processus de cancérogenèse.

Références bibliographiques

Aikawa, J. and Esko, J. D. (1999). Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc *N*-deacetylase/ *N*-sulfotransferase family. *J Biol Chem.* **274**, 2690-2695.

Almeida, R., Levery, S. B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E. P. and Clausen, H. (1999). Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:β-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human β 4-galactosyltransferase gene family. *J Biol Chem.* **274**, 26165-26171.

Amado, M., Almeida, R., Schwientek, T. and Clausen, H. (1999). Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions. *Biochim Biophys Acta* **1473**, 35-53.

Ameye, L. and Young, M. F. (2002). Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* **12**, 107R-16R.

Attwood, J. T., Yung, R. L. and Richardson, B. C. (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* **59**, 241-257.

Bai, X., Zhou, D., Brown, J. R., Crawford, B. E., Hennet, T. and Esko, J. D. (2001). Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans : cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the β1,3-galactosyltransferase family (β3GalT6). *J Biol Chem.* **276**, 48189-48195.

Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L. and Lose, E. J. (1992). Biology of the syndecans : a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol.* **8**, 365-393.

Bi, X., Tong, C., Dockendorff, A., Bancroft, L., Gallagher, L., Guzman, G., Iozzo, R. V., Augenlicht, L. H. and Yang, W. (2008). Genetic deficiency of decorin causes intestinal tumor formation through disruption of intestinal cell maturation. *Carcinogenesis* **29**, 1435-1440.

Bi, Y., Nielsen, K. L., Kilts, T. M., Yoon, A., M, A. K., Wimer, H. F., Greenfield, E. M., Heegaard, A. M. and Young, M. F. (2006). Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. *Bone* **38**, 778-786.

Bishop, J. R., Schuksz, M. and Esko, J. D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030-1037.

Border, W. A., Noble, N. A., Yamamoto, T., Harper, J. R., Yamaguchi, Y., Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E. (1992). Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* **360**, 361-364.

Bourne, Y. and Henrissat, B. (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol.* **11**, 593-600.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.

Brecht, M., Mayer, U., Schlosser, E. and Prehm, P. (1986). Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem J.* **239**, 445-450.

Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koca, J. and Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* **261**, 29R-37R

Burzynski, S. R. (2005). Aging : gene silencing or gene activation ? *Med Hypotheses* **64**, 201-208.

Busse, M., Feta, A., Presto, J., Wilen, M., Grønning, M., Kjellen, L. and Kusche-Gullberg, M. (2007). Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J Biol Chem.* **282**, 32802-32810.

Carlsson, P., Presto, J., Spillmann, D., Lindahl, U. and Kjellen, L. (2008). Heparin/heparan sulfate biosynthesis: processive formation of *N*-sulfated domains. *J Biol Chem.* **283**, 20008-20014.

Cohen-Kaplan, V., Naroditsky, I., Zetser, A., Ilan, N., Vlodavsky, I. and Doweck, I. (2008). Heparanase induces VEGF C and facilitates tumor lymphangiogenesis. *Int J Cancer* **123**, 2566-2573.

Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E. and Iozzo, R. V. (1997). Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol.* **136**, 729-743.

Dick, G., Grondahl, F. and Prydz, K. (2008). Overexpression of the 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) transporter 1 increases sulfation of chondroitin sulfate in the apical pathway of MDCK II cells. *Glycobiology* **18**, 53-65.

Dominguez, G., Carballido, J., Silva, J., Silva, J. M., Garcia, J. M., Menendez, J., Provencio, M., Espana, P. and Bonilla, F. (2002). p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* **8**, 980-5.

Ducasse, M. and Brown, M. A. (2006). Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer* **5**, 60.

Dudhia, J., Davidson, C. M., Wells, T. M., Hardingham, T. E. and Bayliss, M. T. (1996). Studies on the G3 domain of aggrecan from human cartilage. *Ann N Y Acad Sci.* **785**, 245-247.

Duncan, G., McCormick, C. and Tufaro, F. (2001). The link between heparan sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins. *J Clin Invest.* **108**, 511-516.

Elenius, K. and Jalkanen, M. (1994). Function of the syndecans - a family of cell surface proteoglycans. *J Cell Sci.* **107 (Pt 11)**, 2975-2982.

Esko, J., Kimata, K. and Lindahl, U. (2009). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. La Jolla : The Consortium of Glycobiology Editors.

Esko, J. D., Weinke, J. L., Taylor, W. H., Ekborg, G., Roden, L., Anantharamaiah, G. and Gawish, A. (1987). Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in Chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I. *J Biol Chem.* **262**, 12189-12195.

Esko, J. D. and Zhang, L. (1996). Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr Opin Struct Biol.* **6**, 663-670.

Fadic, R., Mezzano, V., Alvarez, K., Cabrera, D., Holmgren, J. and Brandan, E. (2006). Increase in decorin and biglycan in Duchenne Muscular Dystrophy: role of fibroblasts as cell source of these proteoglycans in the disease. *J Cell Mol Med.* **10**, 758-769.

Filmus, J. and Selleck, S. B. (2001). Glypicans : proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest.* **108**, 497-501.

Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L. and Kjellen, L. (1999). Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* **400**, 773-776.

Fukushima, K., Badlani, N., Usas, A., Riano, F., Fu, F. and Huard, J. (2001). The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med.* **29**, 394-402.

Garcia, V., Garcia, J. M., Silva, J., Pena, C., Dominguez, G., Lorenzo, Y., Diaz, R., Alonso, I., Colas, A., Hurtado, A. et al. (2008). Levels of VEGF-A mRNA in plasma from patients with colorectal carcinoma as possible surrogate marker of angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* **134**, 1165-1171.

Gastinel, L. N., Cambillau, C. and Bourne, Y. (1999). Crystal structures of the bovine β 4-galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *EMBO J.* **18**, 3546-3557.

Gotoh, M., Yada, T., Sato, T., Akashima, T., Iwasaki, H., Mochizuki, H., Inaba, N., Togayachi, A., Kudo, T., Watanabe, H. et al. (2002). Molecular cloning and characterization of a novel chondroitin sulfate glucuronyltransferase that transfers glucuronic acid to N-acetylgalactosamine. *J Biol Chem.* **277**, 38179-38188.

Götte, M. and Kresse, H. (2005). Defective glycosaminoglycan substitution of decorin in a patient with progeroid syndrome is a direct consequence of two point mutations in the galactosyltransferase I (β 4GalT-7) gene. *Biochem Genet.* **43**, 65-77.

Götting, C., Kuhn, J. and Kleesiek, K. (2007a). Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* **64**, 1498-1517.

Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T. and Kleesiek, K. (2000). Molecular cloning and expression of human UDP-D-Xylose :proteoglycan core protein β -D-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J Mol Biol.* **304**, 517-528.

Götting, C., Prante, C., Kuhn, J. and Kleesiek, K. (2007b). Proteoglycan biosynthesis during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Scientific World Journal* **7**, 1207-1210.

Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J. C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M. and Fournel-Gigleux, S. (2005). Phosphorylation and Sulfation of Oligosaccharide Substrates Critically Influence the Activity of Human β 1,4-Galactosyltransferase 7 (GalT-I) and β 1,3-Glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) Involved in the Biosynthesis of the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans. *J Biol Chem.* **280**, 1417-1425.

Ha, Y. W., Jeon, B. T., Moon, S. H., Toyoda, H., Toida, T., Linhardt, R. J. and Kim, Y. S. (2005). Characterization of heparan sulfate from the unossified antler of *Cervus elaphus*. *Carbohydr Res.* **340**, 411-416.

HajMohammadi, S., Enjyoji, K., Princivale, M., Christi, P., Lech, M., Beeler, D., Rayburn, H., Schwartz, J. J., Barzegar, S., de Agostini, A. I. et al. (2003). Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis. *J Clin Invest.* **111**, 989-999.

Hameetman, L., David, G., Yavas, A., White, S. J., Taminiau, A. H., Cleton-Jansen, A. M., Hogendoorn, P. C. and Bovee, J. V. (2007). Decreased EXT expression and

intracellular accumulation of heparan sulphate proteoglycan in osteochondromas and peripheral chondrosarcomas. *J Pathol.* **211**, 399-409.

Harenberg, J., Kakkar, A., Bergqvist, D., Barrowcliffe, T., Casu, B., Fareed, J., Mismetti, P., Ofosu, F. A., Raake, W., Samama, M. et al. (2009). Recommendations on biosimilar low-molecular-weight heparins. *J Thromb Haemost.* **7**, 1222-1225.

Hennekam, R. C. (1991). Hereditary multiple exostoses. *J Med Genet.* **28**, 262-266.

Hennet, T. (2002). The galactosyltransferase family. *Cell Mol Life Sci.* **59**, 1081-1095.

Hocking, A. M., Shinomura, T. and McQuillan, D. J. (1998). Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* **17**, 1-19.

Holmborn, K., Ledin, J., Smeds, E., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L. (2004). Heparan sulfate synthesized by mouse embryonic stem cells deficient in NDST1 and NDST2 is 6-*O*-sulfated but contains no *N*-sulfate groups. *J Biol Chem.* **279**, 42355-42358.

Kamimura, K., Rhodes, J. M., Ueda, R., McNeely, M., Shukla, D., Kimata, K., Spear, P. G., Shworak, N. W. and Nakato, H. (2004). Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-*O*-sulfotransferase. *J Cell Biol.* **166**, 1069-1079.

Kim, B. T., Kitagawa, H., Tamura, J., Saito, T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. and Sugahara, K. (2001). Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode α 1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7176-7181.

Kitagawa, H., Egusa, N., Tamura, J. I., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. and Sugahara, K. (2001). rib-2, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the human tumor suppressor EXT genes encodes a novel α 1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferase involved in the biosynthetic initiation and elongation of heparan sulfate. *J Biol Chem.* **276**, 4834-4838.

Kitagawa, H., Shimakawa, H. and Sugahara, K. (1999). The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an α 1,4-*N*-acetylhexosaminyltransferase that transfers *N*-acetylgalactosamine and *N*-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. *J Biol Chem.* **274**, 13933-13937.

Kitagawa, H., Tanaka, Y., Tsuchida, K., Goto, F., Ogawa, T., Lidholt, K., Lindahl, U. and Sugahara, K. (1995). *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) transfer to the common carbohydrate-protein linkage region of sulfated glycosaminoglycans. Identification of UDP-GalNAc : chondro-oligosaccharide α -*N*-acetylgalactosaminyltransferase in fetal bovine serum. *J Biol Chem.* **270**, 22190-22195.

Kitagawa, H., Tone, Y., Tamura, J., Neumann, K. W., Ogawa, T., Oka, O., Kawasaki, T. and Sugahara, K. (1998). Molecular cloning of glucuronosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J Biol Chem.* **273**, 6615-6618.

Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ikegami-Kuzuhara, A., Nadanaka, S., Goto, F., Ogawa, T. and Sugahara, K. (2008). Sulfation of the galactose residues in the glycosaminoglycan-protein linkage region by recombinant human chondroitin 6-O-sulfotransferase-1. *J Biol Chem.* **283**, 27438-27443.

Kitayama, K., Hayashida, Y., Nishida, K. and Akama, T. O. (2007). Enzymes responsible for synthesis of corneal keratan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* **282**, 30085-30096.

Kjellen, L. and Lindahl, U. (1991). Proteoglycans : structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* **60**, 443-475.

Kolset, S. O., Ehlorsson, J., Kjellen, L. and Lindahl, U. (1986). Effect of benzyl β -D-xyloside on the biosynthesis of chondroitin sulphate proteoglycan in cultured human monocytes. *Biochem J.* **238**, 209-216.

Kolset, S. O., Sakurai, K., Ivhed, I., Overvatn, A. and Suzuki, S. (1990). The effect of β -D-xylosides on the proliferation and proteoglycan biosynthesis of monoblastic U-937 cells. *Biochem J.* **265**, 637-645.

Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Ikuta, Y., Fukuma, D., Yokomine, K., Harao, M., Beppu, T. et al. (2006). Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* **12**, 2689-2697.

Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L. (2003). Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol.* **13**, 605-611.

Lai, J. P., Sandhu, D. S., Shire, A. M. and Roberts, L. R. (2008). The tumor suppressor function of human sulfatase 1 (SULF1) in carcinogenesis. *J Gastrointest Cancer* **39**, 149-158.

Li, J., Kleeff, J., Abiatari, I., Kayed, H., Giese, N. A., Felix, K., Giese, T., Buchler, M. W. and Friess, H. (2005). Enhanced levels of Hsulf-1 interfere with heparin-binding growth factor signaling in pancreatic cancer. *Mol Cancer* **4**, 14.

Lidholt, K., Fjelstad, M., Lindahl, U., Goto, F., Ogawa, T., Kitagawa, H. and Sugahara, K. (1997). Assessment of glycosaminoglycan-protein linkage tetrasaccharides as

acceptors for GalNAc- and GlcNAc-transferases from mouse mastocytoma. *Glycoconj J.* **14**, 737-42.

Lidholt, K., Weinke, J. L., Kiser, C. S., Lagemwa, F. N., Bame, K. J., Cheifetz, S., Massague, J., Lindahl, U. and Esko, J. D. (1992). A single mutation affects both *N*-acetylglucosaminyltransferase and glucuronosyltransferase activities in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in heparan sulfate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 2267-2271.

Lin, X., Wei, G., Shi, Z., Dryer, L., Esko, J. D., Wells, D. E. and Matzuk, M. M. (2000). Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* **224**, 299-311.

Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U. and Lidholt, K. (1998). The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem.* **173**, 26265-26268.

Lindahl, U. (2007). Heparan sulfate-protein interactions - a concept for drug design? *Thromb Haemost* **98**, 109-115.

Lindahl, U., Backstrom, G. and Thunberg, L. (1983). The antithrombin-binding sequence in heparin. Identification of an essential 6-*O*-sulfate group. *J Biol Chem.* **258**, 9826-9830.

Liu, D., Shriver, Z., Venkataraman, G., El Shabrawi, Y. and Sasisekharan, R. (2002). Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 568-573.

Liu, J., Shriver, Z., Blaiklock, P., Yoshida, K., Sasisekharan, R. and Rosenberg, R. D. (1999). Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-3A sulfates *N*-unsubstituted glucosamine residues. *J Biol Chem.* **274**, 38155-38162.

Lu, Q., Qiu, X., Hu, N., Wen, H., Su, Y. and Richardson, B. C. (2006). Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. *Ageing Res Rev.* **5**, 449-467.

Lagemwa, F. N., Sarkar, A. K. and Esko, J. D. (1996). Unusual β -D-xylosides that prime glycosaminoglycans in animal cells. *J Biol Chem.* **271**, 19159-19165.

Mahalingam, Y., Gallagher, J. T. and Couchman, J. R. (2007). Cellular adhesion responses to the heparin-binding (HepII) domain of fibronectin require heparan sulfate with specific properties. *J Biol Chem.* **282**, 3221-3230.

Mani, K., Havsmark, B., Persson, S., Kaneda, Y., Yamamoto, H., Sakurai, K., Ashikari, S., Habuchi, H., Suzuki, S., Kimata, K. et al. (1998).

Heparan/chondroitin/dermatan sulfate primer 2-(6-hydroxynaphthyl)-*O*- β -D-xylopyranoside preferentially inhibits growth of transformed cells. *Cancer Res.* **58**, 1099-1104.

Mann, D. M., Yamaguchi, Y., Bourdon, M. A. and Ruoslahti, E. (1990). Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* **265**, 5317-5323.

Martin, N. B., Masson, P., Sepulchre, C., Theveniaux, J., Millet, J. and Bellamy, F. (1996). Pharmacologic and biochemical profiles of new venous antithrombotic β -D-xyloside derivatives: potential antiathero/thrombotic drugs. *Semin Thromb Hemost.* **22**, 247-254.

Matuoka, K., Namba, M. and Mitsui, Y. (1987). Hyaluronate synthetase inhibition by normal and transformed human fibroblasts during growth reduction. *J Cell Biol.* **104**, 1105-1115.

Miura, Y. and Freeze, H. H. (1998). Alpha-*N*-acetylgalactosamine-capping of chondroitin sulfate core region oligosaccharides primed on xylosides. *Glycobiology* **8**, 813-819.

Miyamoto, K., Asada, K., Fukutomi, T., Okochi, E., Yagi, Y., Hasegawa, T., Asahara, T., Sugimura, T. and Ushijima, T. (2003). Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-*O*-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* **22**, 274-280.

Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y. and Kimata, K. (2008). Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate : Enzymatic formation and tissue distribution. *J Biol Chem.*

Mundhenke, C., Meyer, K., Drew, S and Friedl, A. (2002). Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am J Pathol.* **160**, 185-194

Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet.* **23**, 58-61.

Niers, T. M., Klerk, C. P., DiNisio, M., Van Noorden, C. J., Buller, H. R., Reitsma, P. H. and Richel, D. J. (2007). Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol.* **61**, 195-207.

Nomura, T., Takizawa, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Imokawa, G., Dohmae, N., Takio, K., Hattori, M. and Matsuo, N. (1998). Purification,

cDNA Cloning, and Expression of UDP-Gal: Glucosylceramide β -1,4-Galactosyltransferase from Rat Brain. *J Biol Chem.* **273**, 13570-13577.

Ogishima, T., Shiina, H., Breault, J. E., Tabatabai, L., Bassett, W. W., Enokida, H., Li, L. C., Kawakami, T., Urakami, S. and Ribeiro-Filho, L. A. (2005). Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* **11**, 1028-1036.

Okajima, T., Fukumoto, S., Furukawa, K. and Urano, T. (1999a). Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome. Identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene. *J Biol Chem.* **274**, 28841-28844.

Okajima, T., Yoshida, K., Kondo, T. and Furukawa, K. (1999b). Human homolog of *Caenorhabditis elegans* sqv-3 gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J Biol Chem.* **274**, 22915-22918.

Ornitz, D. M. (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* **22**, 108-112.

Paci, M., Maramotti, S., Bellesia, E., Formisano, D., Albertazzi, L., Ricchetti, T., Ferrari, G., Annessi, V., Lasagni, D. and Carbonelli, C. (2009). Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **64**, 92-97.

Pallerla, S. R., Lawrence, R., Lewejohann, L., Pan, Y., Fischer, T., Schlomann, U., Zhang, X., Esko, J. D. and Grobe, K. (2008). Altered heparan sulfate structure in mice with deleted NDST3 gene function. *J Biol Chem.* **283**, 16885-16894.

Pedersen, L. C., Dong, J., Taniguchi, F., Kitagawa, H., Krahn, J. M., Pedersen, L. G., Sugahara, K. and Negishi, M. (2003). Crystal structure of an α 1,4-*N*-acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a member of the exostosin gene family involved in heparan sulfate biosynthesis. *J Biol Chem.* **278**, 14420-14428.

Pertuiset, E. (2002). Efficacité thérapeutique des chondroïtines sulfates dans l'arthrose Méta-analyse différenciée du Chondrosulf. Mise au point sur la structure, la sulfatation et le mode d'action. *Rev Rhum.* **69**, 157-170.

Petitou, M. and van Boeckel, C. A. (2004). A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug ! What comes next ? *Angew Chem Int Ed Engl.* **43**, 3118-3133.

Pikas, D. S., Eriksson, I. and Kjellen, L. (2000). Overexpression of different isoforms of glucosaminyl *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate *N*-sulfation patterns. *Biochemistry* **39**, 4552-4558.

Praillet, C., Grimaud, J. A. and Lortat-Jacob, H. (1998). Les protéoglycanes. I Molécules aux multiples fonctions futures molécules thérapeutiques ? *Med. Sci.* **14**, 412-420.

Prydz, K. and Dalen, K. T. (2000). Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci.* **113 Pt 2**, 193-205.

Qasba, P. K., Ramakrishnan, B. and Boeggeman, E. (2008). Structure and function of β -1,4-galactosyltransferase. *Curr Drug Targets* **9**, 292-309.

Quentin, E., Gladen, A., Roden, L. and Kresse, H. (1990). A genetic defect in the biosynthesis of dermatan sulfate proteoglycan : galactosyltransferase I deficiency in fibroblasts from a patient with a progeroid syndrome. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **87**, 1342-1346.

Ramakrishnan, B., Balaji, P. V. and Qasba, P. K. (2002). Crystal structure of β 1,4-galactosyltransferase complex with UDP-Gal reveals an oligosaccharide acceptor binding site. *J Mol Biol.* **318**, 491-502.

Ramakrishnan, B. and Qasba, P. K. (2001). Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the β 1,4-galactosyltransferase-I. *J Mol Biol.* **310**, 205-218.

Reed, C. C., Gauldie, J. and Iozzo, R. V. (2002). Suppression of tumorigenicity by adenovirus-mediated gene transfer of decorin. *Oncogene* **21**, 3688-3695.

Renard, E., Chadjichristos, C., Kypriotou, M., Beauchef, G., Bordat, P., Domp martin, A., Widom, R. L., Boumediene, K., Pujol, J. P. and Galera, P. (2008). Chondroitin sulphate decreases collagen synthesis in normal and scleroderma fibroblasts through a Smad-independent TGF- β pathway--implication of C-Krox and Sp1. *J Cell Mol Med.* **12**, 2836-2847.

Ringvall, M., Ledin, J., Holmborn, K., van Kuppevelt, T., Ellin, F., Eriksson, I., Olofsson, A. M., Kjellen, L. and Forsberg, E. (2000). Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase-1. *J Biol Chem.* **275**, 25926-25930.

Roach, H. I. and Aigner, T. (2007). DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 128-137.

Roach, H. I., Yamada, N., Cheung, K. S., Tilley, S., Clarke, N. M., Oreffo, R. O., Kokubun, S. and Bronner, F. (2005). Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.* **52**, 3110-3124.

Robinson, H. C. and Lindahl, U. (1981). Effect of cycloheximide, β -D-xylosides and β -D-galactosides on heparin biosynthesis in mouse mastocytoma. *Biochem J.* **194**, 575-586.

Robinson, J., Viti, M. and Hook, M. (1984). Structure and properties of an under-sulfated heparan sulfate proteoglycan synthesized by a rat hepatoma cell line. *J Cell Biol.* **98**, 946-953.

Ronca, F., Palmieri, L., Panicucci, P. and Ronca, G. (1998). Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage* **6 Suppl A**, 14-21.

Ropero, S., Setien, F., Espada, J., Fraga, M. F., Herranz, M., Asp, J., Benassi, M. S., Franchi, A., Patino, A. and Ward, L. S. (2004). Epigenetic loss of the familial tumor-suppressor gene exostosin-1 (EXT1) disrupts heparan sulfate synthesis in cancer cells. *Hum Mol Genet.* **13**, 2753-2765.

Roughley, P. J. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater.* **12**, 92-101.

Rykova, V. I., Grigorieva, E. V., Chernenko, A. V., Eshenko, T. Y. and Dymshits, G. M. (2007). Proteoglycans and human breast cancer. *Bull Exp Biol Med.* **144**, 335-337.

Sanderson, R. D. (2001). Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* **12**, 89-98.

Sanderson, R. D. and Yang, Y. (2008). Syndecan-1 : a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. *Clin Exp Metastasis* **25**, 149-159.

Sanderson, R. D., Yang, Y., Suva, L. J. and Kelly, T. (2004). Heparan sulfate proteoglycans and heparanase-partners in osteolytic tumor growth and metastasis. *Matrix Biol.* **23**, 341-352.

Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G. and Narayanasami, U. (2002). Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 521-528.

Sato, T., Gotoh, M., Kiyohara, K., Akashima, T., Iwasaki, H., Kameyama, A., Mochizuki, H., Yada, T., Inaba, N. and Togayachi, A. (2003). Differential roles of two *N*-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2. Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate. **278**, 3063-3071.

Schon, S., Huet, G., Prante, C., Muller, S., Christ, R., Hagen, F. W., Kuhn, J., Kleesiek, K. and Gotting, C. (2006). Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 442-448.

Schwartz, N. B. and Domowicz, M. (2002). Chondrodysplasias due to proteoglycan defects. *Glycobiology* **12**, 57-68.

Scott, J. E. (1996). Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry* **35**, 8795-8799.

Seidler, D. G., Faiyaz-Ul-Haque, M., Hansen, U., Yip, G. W., Zaidi, S. H., Teebi, A. S., Kiesel, L. and Götte, M. (2006). Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (β 4GalT-7). *J Mol Med.* **84**, 583-594.

Senay, C., Lind, T., Muguruma, K., Tone, Y., Kitagawa, H., Sugahara, K., Lidholt, K., Lindahl, U. and Kusche-Gullberg, M. (2000). The EXT1/EXT2 tumor suppressors : catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO Rep.* **1**, 282-286.

Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D. and Spear, P. G. (1999). A novel role for 3-*O*-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**, 13-22.

Shukla, D. and Spear, P. G. (2001). Herpesviruses and heparan sulfate : an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest.* **108**, 503-510.

Sinha, S. M., Singh, R. D., Alam, N. D., Roy, A. D., Roychoudhury, S. D. and Panda, C. D. (2008). Alterations in candidate genes PHF2, FANCC, PTCH1 and XPA at chromosomal 9q22.3 region : Pathological significance in early and late onset breast carcinoma. *Mol Cancer* **7**, 84.

Stamatoglou, S. C. and Keller, J. M. (1983). Correlation between cell substrate attachment in vitro and cell surface heparan sulfate affinity for fibronectin and collagen. *J Cell Biol.* **96**, 1820-1823.

Stevens, R. L. and Austen, K. F. (1982). Effect of p-nitrophenyl- β -D-xyloside on proteoglycan and glycosaminoglycan biosynthesis in rat serosal mast cell cultures. *J Biol Chem.* **257**, 253-259.

Stickens, D., Zak, B. M., Rougier, N., Esko, J. D. and Werb, Z. (2005). Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses. *Development* **132**, 5055-5068.

Strietholt, S., Maurer, B., Peters, M. A., Pap, T. and Gay, S. (2008). Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* **10**, 219.

Su, G., Blaine, S. A., Qiao, D. and Friedl, A. (2007). Shedding of syndecan-1 by stromal fibroblasts stimulates human breast cancer cell proliferation via FGF2 activation. *J Biol Chem.* **282**, 14906-14915.

Sugahara, K. and Kitagawa, H. (2000). Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr Opin Struct Biol.* **10**, 518-527.

Sugahara, K., Ohi, Y., Harada, T., de Waard, P. and Vliegthart, J. F. (1992). Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. I. Six compounds containing 0 or 1 sulfate and/or phosphate residues. *J Biol Chem.* **267**, 6027-6035.

Superti-Furga, A., Rossi, A., Steinmann, B. and Gitzelmann, R. (1996). A chondrodysplasia family produced by mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter gene : genotype/phenotype correlations. *Am J Med Genet.* **63**, 144-147.

Tone, Y., Pedersen, L. C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J., Negishi, M. and Sugahara, K. (2008). 2-*O*-phosphorylation of xylose and 6-*O*-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis. *J Biol Chem.* **283**, 16801-16807.

Tumova, S., Woods, A. and Couchman, J. R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface : versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol.* **32**, 269-288.

Uyama, T., Kitagawa, H., Tamura Ji, J. and Sugahara, K. (2002). Molecular cloning and expression of human chondroitin *N*-acetylgalactosaminyltransferase: the key enzyme for chain initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate on the protein linkage region tetrasaccharide shared by heparin/heparan sulfate. *J Biol Chem.* **277**, 8841-8846.

Vanpouille, C., Deligny, A., Delehedde, M., Denys, A., Melchior, A., Lienard, X., Lyon, M., Mazurier, J., Fernig, D. G. and Allain, F. (2007). The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-*O*-sulfated *N*-unsubstituted glucosamine residue. *J Biol Chem.* **282**, 24416-24429.

Varghese, S., Theprungsirikul, P., Sahani, S., Hwang, N., Yarema, K. J. and Elisseff, J. H. (2007). Glucosamine modulates chondrocyte proliferation, matrix synthesis, and gene expression. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 59-68.

Venkatesan, N., Barre, L., Benani, A., Netter, P., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S. and Ouzzine, M. (2004). Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery : A strategy to promote cartilage repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18087-18092.

Venkatesan, N., Barre, L., Magdalou, J., Mainard, D., Netter, P., Fournel-Gigleux, S. and Ouzzine, M. (2009). Modulation of xylosyltransferase I expression provides a mechanism regulating glycosaminoglycan chain synthesis during cartilage destruction and repair. *Faseb J* **23**, 813-822.

Vercoutter-Edouart, A. S., Slomianny, M. C., Dekeyzer-Beseme, O., Haeuw, J. F. and Michalski, J. C. (2008). Glycoproteomics and glycomics investigation of membrane N-glycosylproteins from human colon carcinoma cells. *Proteomics* **8**, 3236-3256

Vuillermoz, B., Khoruzhenko, A. and D'Onofrio, M.F. (2004). The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. *Exp Cell Res.* **296**, 294-306.

Wegrowski, Y. and Maquart, F. X. (2006). Chondroitin sulfate proteoglycans in tumor progression. *Adv Pharmacol.* **53**, 297-321.

Wei, G., Bai, X., Gabb, M. M., Bame, K. J., Koshy, T. I., Spear, P. G. and Esko, J. D. (2000). Location of the glucuronosyltransferase domain in the heparan sulfate copolymerase EXT1 by analysis of Chinese hamster ovary cell mutants. *J Biol Chem.* **275**, 27733-27740.

Xu, D., Tiwari, V., Xia, G., Clement, C., Shukla, D. and Liu, J. (2005). Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem J.* **385**, 451-459.

Yabe, T., Shukla, D., Spear, P. G., Rosenberg, R. D., Seeberger, P. H. and Shworak, N. W. (2001). Portable sulphotransferase domain determines sequence specificity of heparan sulphate 3-O-sulphotransferases. *Biochem J.* **359**, 235-241.

Yada, T., Gotoh, M., Sato, T., Shionyu, M., Go, M., Kaseyama, H., Iwasaki, H., Kikuchi, N., Kwon, Y. D. and Togayachi, A. (2003a). Chondroitin sulfate synthase-2. Molecular cloning and characterization of a novel human glycosyltransferase homologous to chondroitin sulfate glucuronyltransferase, which has dual enzymatic activities. *J Biol Chem.* **278**, 30235-30247.

Yada, T., Sato, T., Kaseyama, H., Gotoh, M., Iwasaki, H., Kikuchi, N., Kwon, Y. D., Togayachi, A., Kudo, T. and Watanabe, H. (2003b). Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem.* **278**, 39711-39725.

Yang, Y., Macleod, V., Miao, H. Q., Theus, A., Zhan, F., Shaughnessy, J. D., Jr., Sawyer, J., Li, J. P., Zcharia, E. and Vlodaysky, I. (2007). Heparanase enhances syndecan-1 shedding : a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem.* **282**, 13326-13333.

Ye, S., Luo, Y., Lu, W., Jones, R. B., Linhardt, R. J., Capila, I., Toida, T., Kan, M., Pelletier, H. and McKeehan, W. L. (2001). Structural basis for interaction of FGF-1, FGF-2, and FGF-7 with different heparan sulfate motifs. *Biochemistry* **40**, 14429-14439.

Zak, B. M., Crawford, B. E. and Esko, J. D. (2002). Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochim Biophys Acta* **1573**, 346-355.

Zhang, L. and Esko, J. D. (1994). Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan. *J Biol Chem.* **269**, 19295-19299.

Zhang, Y., Swaminathan, G. J., Deshpande, A., Boix, E., Natesh, R., Xie, Z., Acharya, K. R. and Brew, K. (2003). Roles of individual enzyme-substrate interactions by α -1,3-galactosyltransferase in catalysis and specificity. *Biochemistry* **42**, 13512-13521.

Zhang, Z., Deng, C., Lu, Q. and Richardson, B. (2002). Age-dependent DNA methylation changes in the ITGAL (CD11a) promoter. *Mech Ageing Dev.* **123**, 1257-1268.

Zhou, L., Cheng, X., Connolly, B. A., Dickman, M. J., Hurd, P. J. and Hornby, D. P. (2002). Zebularine : a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol.* **321**, 591-599.